

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie  
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Histologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Pathogenese  
des *Prolapsus vaginae ante partum* beim Schaf**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
SUSANNE KLOSS

Gießen 2004







Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie  
der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: PD Dr. A. Wehrend

**Histologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Pathogenese  
des *Prolapsus vaginae ante partum* beim Schaf**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
SUSANNE KLOSS  
Tierärztin aus Bochum

Gießen 2004

Mit Genehmigung des Fachbereiches für Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: \_\_\_\_\_ Prof. Dr. M Reinacher

---

1. Berichterstatter: \_\_\_\_\_ PD Dr. A. Wehrend

2. Berichterstatter: \_\_\_\_\_ Prof. Dr. M. Bergmann

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_ 15.November 2004

**Meiner Familie  
und Stephan**





# INHALTSVERZEICHNIS

Kapitel	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. Anatomischer Aufbau von Vagina und <i>Cervix uteri</i>	3
2.2. Struktur und Metabolismus des kollagenen Bindegewebes	5
2.3. Physiologische Veränderungen der Steroidhormonkonzentration während der Gravidität und der Geburt beim Schaf	8
2.4. Physiologische Veränderungen der vaginalen und zervikalen Strukturen während der Gravidität und der Geburt beim Schaf	9
2.5. <i>Prolapsus vaginae ante partum</i> beim Schaf	15
2.5.1. Wesen und Vorkommen des <i>Prolapsus vaginae ante partum</i>	15
2.5.2. Ätiologie und Pathogenese des ovinen <i>Prolapsus vaginae ante partum</i>	16
2.5.3. Diagnostik, Therapie und Folgen eines <i>Prolapsus vaginae ante partum</i>	19
3. MATERIAL UND METHODIK	23
3.1. Material	23
3.1.1. Tierkollektiv	23
3.1.2. Gruppeneinteilung	23
3.1.3. Unterbringung und Fütterung	26
3.1.4. Klinische Untersuchung der Probanden	26
3.2. Methodik	28
3.2.1. Probenentnahme und Lagerung	28
3.2.1.1. Entnahme der venösen Blutproben	28
3.2.1.2. Entnahme von Vaginalgewebe	29
3.2.2. Blutuntersuchungen	30
3.2.2.1. Bestimmung der Plasma-Elektrolytkonzentrationen	30
3.2.2.2. Endokrinologische Untersuchungen	30
3.2.3. Molekularbiologische Techniken	31
3.2.3.1. Allgemeine Maßnahmen	31
3.2.3.2. RNA-Isolation	32

3.2.3.3.	Quantitative Bestimmung der RNA	33
3.2.3.4.	Überprüfung der Intaktheit der RNA	34
3.2.3.5.	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion	34
3.2.3.5.1.	Eliminierung genomischer DNA-Kontaminationen	35
3.2.3.5.2.	Reverse Transkription	36
3.2.3.5.3.	Amplifikation der cDNA durch PCR	36
3.2.3.5.4.	Verwendete Primer	37
3.2.3.5.5.	Reaktionsbedingungen der PCR	40
3.2.3.6.	Darstellung der RT-PCR Produkte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese	40
3.2.3.7.	Optimierung der PCR-Protokolle für die semiquantitative Auswertung	41
3.2.3.8.	Semiquantitative Auswertung der Expressionsrate	42
3.2.3.8.1.	Erstellung einer Standardkurve	42
3.2.3.8.2.	Berechnung der Rohdaten	43
3.2.3.8.3.	Normalisierung der Rohdaten	44
3.2.3.9.	Sequenzierung des cDNA-Fragments der $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I und des Östrogenrezeptor $\alpha$	44
3.2.4.	Histologische Techniken	45
3.2.4.1.	Probenaufbereitung	45
3.2.4.2.	Färbemethoden	46
3.2.4.3.	Histologische Auswertung	47
3.2.5.	Statistische Verfahren	48
4.	ERGEBNISSE	49
4.1.	Klinische Ergebnisse	49
4.1.1.	Klinische Befunde zum Zeitpunkt der Probenentnahme	49
4.1.2.	Intervall zwischen Probenentnahme und Partus	50
4.1.3.	Verlauf der Geburt, Lämmeranzahl und perinatale Sterblichkeit	52
4.2.	Blutuntersuchungen	54
4.2.1.	Plasmaelektrolytkonzentrationen	54
4.2.1.1.	Gesamt-Kalzium	55
4.2.1.2.	Anorganisches Phosphat	56
4.2.1.3.	Magnesium	58

4.2.1.4.	Natrium	60
4.2.2.	Hormonkonzentrationen	62
4.2.2.1.	Progesteron	62
4.2.2.2.	Östradiol-17 $\beta$	64
4.3.	Molekularbiologische Ergebnisse	66
4.3.1.	Vorversuche	66
4.3.1.1.	RNA-Isolation	66
4.3.1.2.	Optimierung der PCR-Bedingungen	67
4.3.1.3.	Festlegung der Zyklenzahl zur Bestimmung der exponentiellen Amplifizierungsphase	69
4.3.2.	Hauptversuche	71
4.3.2.1.	Expression der mRNA von Kollagen I	71
4.3.2.2.	Expression der mRNA der MMP1 und des TIMP 1	75
4.3.2.3.	Expression der mRNA des Östrogenrezeptors $\alpha$	83
4.3.2.4.	Sequenzierung des cDNA-Fragments der $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I und des Östrogenrezeptor $\alpha$	86
4.4.	Histologische Ergebnisse	92
4.4.1.	Allgemeine Beschreibung	92
4.4.2.	Morphologie des Epithels	97
5.	DISKUSSION	105
5.1.	Diskussion der Methode	105
5.2.	Diskussion der klinischen Befunde	108
5.3.	Diskussion der Ergebnisse der Blutuntersuchungen	110
5.4.	Diskussion der molekularbiologischen Ergebnisse	114
5.5.	Diskussion der histologischen Ergebnisse	119
5.6.	Schlußbetrachtung	124
6.	ZUSAMMENFASSUNG	126
7.	SUMMARY	129
8.	LITERATURVERZEICHNIS	132

9.	ANHANG	148
9.1.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	148
9.2.	Chemikalien und Enzyme	149
9.3.	Lösungen	150
9.4.	Abkürzungsverzeichnis	153





## 1. EINLEITUNG

Der *Prolapsus vaginae* spielt als vorgeburtliche Störung beim Schaf eine besondere Rolle. Keine andere Spezies unter den Haussäugetieren leidet vergleichbar häufig an dieser Erkrankung (DE BOIS und VAN DER WEIJDEN, 1993; BOSTEDT, 1996b; BUSCH, 2001). Die Inzidenz schwankt herdenabhängig zwischen 0,1 % und > 15 % (EDGAR, 1952; LOW und SUTHERLAND, 1987). Aus ökonomischen und betriebstechnischen Gesichtspunkten ist diese Erkrankung neben den direkten Verlusten vor allem wegen ihrer Folgen bedeutsam. So erfordert das vermehrte Auftreten von Dystokien eine intensive Kontrolle der betroffenen Tiere, des weiteren besteht ein gegenüber Normalgeburten stark erhöhtes Risiko perinataler Lämmersterblichkeit (RÜSCH und BERCHTOLD, 1978; SOBIRAJ, 1990; KLOSS et al., 2002).

Trotz zahlreicher Untersuchungen zur Pathogenese dieser Erkrankung, die auf endokrinologischer, stoffwechsel- und fütterungsbedingter Basis gesehen wird, ist die Ätiologie nicht endgültig aufgedeckt (SOBIRAJ et al., 1986; BOSTEDT, 1988; SOBIRAJ, 1990; HOSIE et al., 1991; BOSTEDT, 1996b; HOFMANN, 1998). Die im Schrifttum erläuterten Prädispositionen erklären den antepartalen Vaginalprolaps für den individuellen Fall oder dessen Häufung auf Herdenbasis. Zufriedenstellende kausale Zusammenhänge über die speziesspezifische Besonderheit dieser Erkrankung beim Schaf liegen jedoch bislang noch nicht vor.

Aus den genannten Gründen ergab sich die Aufgabenstellung dieser Arbeit, tiefergehende Erklärungsansätze der Ätiologie des antepartalen *Prolapsus vaginae* beim Schaf unter Berücksichtigung der endokrinologischen Situation und der Elektrolythomöostase zu erhalten. Zur Überprüfung der Hypothese, dass Aberrationen im kollagenen Bindegewebsstoffwechsel betroffener Tiere vorliegen, sollte die Genexpression ausgewählter Parameter des Kollagenmetabolismus untersucht werden. Des weiteren stellte sich die Frage nach einer möglicherweise erhöhten Expression des Östrogenrezeptors  $\alpha$  bei Schafen mit einem Vaginalprolaps, die über eine verstärkte, lokale Östrogenwirkung zur Ausprägung des Krankheitsbildes führen könnte. Zusätzlich zu den Studien der Expressionsrate ausgewählter Moleküle des

Bindegewebsstoffwechsels sollte das Vaginalgewebe von Patienten mit *Prolapsus vaginae ante partum*, gesunden Tieren im gleichen Gestationsstadium und Schafen *intra partum* histologisch verglichen werden.



## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Anatomischer Aufbau von Vagina und *Cervix uteri*

Der Vaginalkanal und die Zervix der Haussäugetiere entstehen während der embryonalen Entwicklung aus der Verschmelzung des distalen Endes der beiden *Ductus paramesonephrici* (SCHNORR und KRESSIN, 2001).

Topographisch gesehen befinden sich die kranialen Anteile der Vagina und die Zervix von *Serosa* überzogen im peritonealen Teil der Beckenhöhle zwischen dem Rektum und der Harnblase. Der kaudale Abschnitt des Vaginalkanals und der Scheidenvorhof, *Vestibulum vaginae*, verlaufen retroperitoneal und sind in eine bindegewebige Schicht, der *Adventitia*, eingebettet (LEISER, 1990).

Als Verbindung von Vagina zum Uterus schließt sich die Zervix in kaudaler Verlängerung an das *Corpus uteri* an. Die Länge der Zervix wird von AUGHEY et al. (1983) mit 5,2 - 6,0 cm, von MORE (1984) im Mittel mit 5,5 cm angegeben; KRISTINSSON und WISSDORF (1985) maßen durchschnittlich 6,3 cm. Durch ihren hohen Bindegewebsanteil von 81,9 % erhält sie eine derbe Konsistenz und läßt sich palpatorisch eindeutig von der Vagina und dem Uterus abgrenzen (KRISTINSSON und WISSDORF, 1985; SCHUH, 1993). Das ovine *Ostium uteri internum* ist nur undeutlich ausgebildet (KRISTINSSON und WISSDORF, 1985; LEISER, 1999). Innerhalb der Zervix bilden Verdickungen der Wand 5 - 6 hintereinander liegende, charakteristisch ausgeprägte *Pulvini cervicales*, deren Funktion als eine Art Verschlußmechanismus des Zervikalkanals anzusehen ist (MORE, 1984; KRISTINSSON und WISSDORF, 1985; LEISER, 1999). Das *Ostium uteri externum* befindet sich beim Schaf auf dem Boden der Vagina und ist im juvenilen Zustand von einer querverlaufenden, wallartigen Schleimhautfalte verdeckt, die bei multiparen Tieren nur noch undeutlich zu erkennen ist (KRISTINSSON und WISSDORF, 1985). Es wird von der morphologisch sehr vielgestaltigen *Portio vaginalis cervicis* geformt, die in den kranialen Abschnitt der Vagina, das sogenannte Scheidengewölbe oder *Fornix vaginae*, hineinragt (HALBERT et al., 1990).

Die *Vagina propria* setzt sich aus dem *Fornix vaginae* und dem daraus hervorgehenden Vaginalkanal, *Canalis vaginalis*, zusammen. Sie wird nach kaudal durch das rudimentär vorhandene *Hymen* vom *Vestibulum vaginae* abgegrenzt (LEISER, 1999). Ihre Oberfläche weist eine deutliche Längsfaltenbildung auf, um die starke Dehnung der Wand unter der Geburt zu ermöglichen (SMOLLICH, 1992).

Die Blutversorgung von Zervix und Vagina erfolgt durch Äste der *Arteria* und *Vena vaginalis*, der Abfluß aus den zahlreichen Lymphgefäßen wird über die *Lymphonodi iliaci mediales*, *sacrales* und *anorectales* gewährleistet. Die vegetative Innervation geschieht über den *Plexus pelvinus*; die sensiblen und motorischen Nervenfasern entstammen dem *Plexus sacralis* sowie dem *Nervus pudendus* und dem *Nervus rectalis caudalis* (LEISER, 1999).

Histologisch zeigt die Wand der Vagina und der Zervix der Haussäugetiere einen dreischichtigen Aufbau. Luminal befindet sich eine kutane Schleimhaut, *Tunica mucosa*, darunter folgt eine Muskelschicht, *Tunica muscularis*. Die äußere Umhüllung der *Cervix uteri* und der intraperitonealen Abschnitte der Vagina besteht aus einem serösen Überzug, der *Tunica serosa*. Die retroperitonealen Anteile des *Canalis vaginalis* werden von einer Bindegewebsschicht umgeben, der *Adventitia*. Morphologisch kann die *Tunica mucosa* weiter in das *Epithelium mucosae* und die darunterliegende *Lamina propria mucosae* unterteilt werden. Diese Schicht enthält außer lockerem, kollagenem Bindegewebe elastische Fasern, Lymph- und Blutgefäße mit einem zum Teil recht stark ausgebildeten Venenplexus (PRIEDKALNS, 1987; LEISER, 1990; SMOLLICH, 1992). Des weiteren können verschiedene Zellpopulationen zwischen den Kollagenfasern identifiziert werden (AUGHEY et al., 1983; SMOLLICH, 1992). In der *Tunica muscularis* befinden sich glatte Muskelfaserbündel, umgeben von einem ausgeprägten, bindegewebigen Gerüst. Aufgrund des unterschiedlichen Faserverlaufs sind eine stärkere *Lamina muscularis circularis* und eine schwächere *Lamina muscularis longitudinalis* zu unterscheiden (LEISER, 1990; SMOLLICH, 1992; SCHUH, 1993). Innerhalb der Bindegewebszüge lassen sich nur wenige Fibrozyten erkennen (AUGHEY et al., 1983). Die *Tunica adventitia* der Vagina beherbergt größere Gefäße und Nervenfasern, die von lockerem Bindegewebe umgeben sind (MANABE und YOSHIDA, 1986; LIEBICH, 1999a).

Die Differenzierung zwischen Vagina und Zervix kann histologisch eindeutig nur anhand der Morphologie des Epithels vorgenommen werden, da sich die subepithelialen Schichten in ihrem Aufbau lediglich geringfügig unterscheiden. So wird die lumenwärtige Seite der *Tunica mucosa* der Zervix von zahlreichen Autoren als einschichtiges, hochprismatisches Epithel beschrieben, in das Becherzellen, Muzin sezernierende und Zilien tragende Zellen eingefügt sind (AUGHEY et al., 1983; MORE, 1984; PRIEDKALNS, 1987; LIEBICH, 1999a).

Die Vagina hingegen ist mit einem mehrschichtigen Plattenepithel ausgekleidet (MITCHELL, 1972; PRIEDKALNS, 1987; SMOLLICH, 1992; LIEBICH, 1999a), dessen Anzahl an Schichten beim Rind von kranial nach kaudal von zwei auf bis zu zehn Schichten zunimmt (WROBEL et al., 1986). Von apikal nach luminal können ein *Stratum basale* mit kleineren, mehr kubiodalen, teilungsfähigen Zellen, ein *Stratum intermedium* bestehend aus polygonalen Zellen sowie ein *Stratum superficiale* unterschieden werden (LEISER, 1990). Beim Schaf erscheinen die Epithelzellen des *Stratum superficiale* im ingraviden Zustand dorso-ventral abgeflacht und teilweise verhornt (MITCHELL, 1972).

## 2.2. Struktur und Metabolismus des kollagenen Bindegewebes

Die Grundstruktur des kollagenen Bindegewebes der Säugetiere wird aus zellulären und extrazellulären Komponenten gebildet. Hierbei nimmt die sogenannte Interzelluarsubstanz oder extrazelluläre Matrix einen besonderen Stellenwert für die Form und Festigkeit verschiedener Organe ein. Sie besteht aus faserigen Anteilen und einer amorphen Grundsubstanz. Den in diese Matrix eingebetteten Zellen obliegen verschiedenste Funktionen bei der Umgestaltung des Gewebes oder bei der Genese von Erkrankungen (LIEBICH, 1999b).

### *Zellen des kollagenen Bindegewebes*

Innerhalb der Zellpopulationen des subepithelialen Bindegewebes können zwei verschiedene Grundtypen charakterisiert werden. Die eine Fraktion ist ortsgebunden und unbeweglich, die andere setzt sich aus freien, mobilen Zellen zusammen. Zur letzten Gruppe gehören im vaginalen und zervikalen Bindegewebe extravasale

Lymphozyten, Eosinophile Granulozyten sowie Makrophagen, Plasmazellen und Mastzellen (LIEBICH, 1999b).

Zu den fixen Zellen werden die Fibrozyten und deren biologisch aktive Form, die Fibroblasten, gezählt. Als wesentliche Funktion dieses Zelltyps ist die Beteiligung an den physiologischen Umbauvorgängen des Bindegewebes hervorzuheben, da außer der Synthese der faserigen Anteile der Interzellulärsubstanz auch eine Produktion kollagenolytischer Proteine und Enzyme geleistet wird (BOSMANN und STAMENKOVIC, 2003).

#### *Amorphe Grundsubstanz*

Neben den strukturgebenden Fasern enthält die extrazelluläre Matrix eine Reihe verschiedener Glykoproteinen, zu denen unter anderem Laminin und Fibronectin gehören, sowie Proteoglykane (AUMAILLEY und GAYRAUD, 1998; BOSMANN und STAMENKOVIC, 2003). Laminine stellen einen Bestandteil der Basalmembran dar und bilden in epithelialem Gewebe eine mechanische und funktionelle Verbindung zwischen den Epithelzellen und der Interzellulärsubstanz, während Fibronectine Aufgaben in der Faserverbindung innehaben (BOSMANN und STAMENKOVIC, 2003). Die Familie der Proteoglykane teilt sich in zahlreiche Untergruppen auf, von deren Grundstruktur aus einem „Core-Protein“ und daran angelagerten Glykosaminoglykanen sich der Name dieser Molekülgruppe ableitet. Trotz des in den letzten Jahren zunehmenden wissenschaftlichen Interesses, sind die biologischen Funktionen der Proteoglykane noch nicht vollständig aufgeklärt. Für Vesican konnten stimulierende Eigenschaften auf die Proliferation von Fibroblasten nachgewiesen werden. Andere Moleküle, wie Decorin, Biglycan und Fibromodulin sind an der Organisation der kollagenen Grundgerüstes beteiligt. Membran-assoziierte, Heparinsulphat tragende Proteoglykane werden in Zusammenhang mit der Migration von Zellen und deren Proliferation und Differenzierung gesehen (BOSMANN und STAMENKOVIC, 2003).

#### *Faserige Grundsubstanz*

Die äußere Gestalt von Organen und Geweben sowie deren Stabilität hängt im Wesentlichen von der Art und der Struktur des Grundgerüstes ab. Die Familie der Kollagene bildet dabei den Hauptbestandteil. Elastische Fasern tragen zur Dehnungsfähigkeit bestimmter Gewebe bei. Im Schrifttum sind bis zu 18

verschiedene Kollagentypen beschrieben worden, von denen Kollagen I bis III, V und XI faserbildend sind (BOSMANN und STAMENKOVIC, 2003). Andere Mitglieder dieser Gruppe assoziieren zu Netzwerken (Typ IV, VIII und X) oder fungieren als Transmembranproteine (BOSMANN und STAMENKOVIC, 2003). In der Vagina und der Zervix konnten überwiegend Kollagen I und III identifiziert werden (JEFFREY, 1991). Die Grundbausteine dieser Fasern, sogenannte  $\alpha$ -Polypeptidketten, werden von Fibroblasten synthetisiert. Im extrazellulären Raum findet eine posttranslationale Modifikation statt, die es den Prokollagenen erlaubt, zu einer Tripelhelix zu aggregieren (HARRIS und KRANE, 1974). Anhand der Kombination der verschiedenen Polypeptidketten lassen sich die Kollagentypen unterscheiden. Die Tripelhelix des Kollagen I setzt sich aus zwei  $\alpha_1$ -Ketten und einer  $\alpha_2$ -Kette zusammen (HARRIS und KRANE, 1974). Durch eine Zusammenlagerung mehrerer Helices entstehen Fibrillen, die wiederum über eine Aggregation zu Fasern letztendlich Kollagenbündel bilden, deren räumliche Anordnung außer von inter- und intramolekularen, kovalenten Quervernetzungen auch von Proteoglykanen beeinflusst wird (JUNQUEIRA und MONTES, 1983).

### *Matrixmetalloproteinasen*

Eine dominierende Rolle in der Umgestaltung des Bindegewebes spielen die zinkabhängigen, proteolytischen Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Die bei Säugetieren bisher bekannten über 20 Formen dieser Familie wurden anfangs nach ihrer Substratspezifität benannt. Aufgrund neuerer Forschungsergebnisse werden sie jedoch fortlaufend numeriert, da eine deutliche Variabilität in der Substratspezifität der einzelnen MMPs nachgewiesen werden konnte (VISSE und NAGASE, 2003). Wegen ihrer Fähigkeit, intakte Kollagenfasern anzugreifen, erhielt die MMP 1 auch den Beinamen Kollagenase. Andere Enzyme wie die MMP 9 können nur bereits degradierte Moleküle abbauen und werden daher als Gelatinasen bezeichnet. Alle Metalloproteinasen sind an den modulierenden Vorgängen während der embryonalen Gewebsdifferenzierung, dem biologischen Kollagenturnover und bei der Wundheilung beteiligt (BREW et al., 2000; BOSMANN und STAMENKOVIC, 2003). Wie nahezu jeder fixe Zelltyp des Binde- und Stützgewebes sind auch die Fibroblasten zur Synthese von MMPs befähigt. In adultem Gewebe findet eine geringe Expression dieser Enzyme statt, die bei Bedarf über verschiedenste Signale jedoch eine rasante Steigerung erfahren kann (BOSMANN und STAMENKOVIC,

2003). Hierbei spielen neben Steroidhormonen auch Wachstumsfaktoren und Zytokine eine Rolle in der Regulation der Expressionsrate (WOESSNER, 1991; BREW et al., 2000). Eine intrazelluläre Speicherung der zymogenen Vorformen konnte bislang nur in Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen beobachtet werden (WOESSNER, 1991). In der Regel erfolgt die Sekretion der inaktiven Proenzyme in den extrazellulären Raum unmittelbar im Anschluß an ihre Synthese. Die Aktivierung dieser Pro-Enzyme geschieht extrazellulär über eine Kaskade proteolytisch vermittelter Strukturveränderungen (CURRY und OSTEEN, 2001). Die wichtigsten extrazellulären Regulatoren der MMPs stellen ortsständige, inhibitorische Proteine, die *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMP) dar, die von vielen Zellen synthetisiert und in den Extrazellular-Raum sezerniert werden (BOSMANN und STAMENKOVIC, 2003). Das wichtigste Molekül aus der bislang noch kleinen Familie ist die TIMP 1, welche bevorzugt aktiv an Kollagenasen (MMP 1) und Gelatinasen (MMP 9) bindet und diese hemmt (CURRY und OSTEEN, 2001). Zu bemerken ist jedoch, daß CLARK et al. (1994) bei humanen Fibroblasten durch eine hohe Konzentration an TIMP 1 einen Anstieg der Syntheseleistung von MMP 1 *in vitro* erzeugen konnten. Aufgrund dieser Sensibilität im Zusammenspiel aus Aktivierung und Inhibition rufen Störungen in diesem Regulationssystem drastische Konsequenzen hervor. In der Pathogenese von schweren Entzündungsvorgängen sowie der Tumorentstehung und -metastasierung nehmen die MMP daher eine Schlüsselrolle ein (BOSMANN und STAMENKOVIC, 2003).

### **2.3. Physiologische Veränderungen der Steroidhormonkonzentration während der Gravidität und der Geburt beim Schaf**

Anders als bei den Hauswiederkäuern Rind und Ziege spielt das *Corpus luteum* nur in den ersten Wochen der Gravidität eine endokrinologisch wichtige Rolle für den Erhalt der Trächtigkeit. Etwa ab dem 50. - 60. Tag *post conceptionem* geht die Synthese des Progesterons nahezu vollständig auf die Plazenta über, so daß eine Ovariectomie nach diesem Zeitpunkt nicht mehr zu einem Abort führt (THORBURN et al., 1977). Im weiteren Verlauf der Gravidität steigt die Progesteronkonzentration im Plasma kontinuierlich an und erreicht etwa fünffach höhere Werte als während der

lutealen Phase des Zyklus (BASSETT et al., 1969). Der Abfall des Progesteronspiegels beginnt etwa 15 - 5 Tage vor dem Partus und ist mit einem zunehmenden Anstieg des fetalen Kortisols assoziiert (BASSETT et al., 1969; THORBURN et al., 1977). Allerdings werden beim Schaf im Gegensatz zum Rind oder zur Ziege erst einige Stunden *post partum* (p.p.) Basalwerte erreicht ( $< 3,33$  nmol/l); *sub partu* können Konzentrationen über 9 nmol/l beobachtet werden (HOFFMANN, 1993). Der Verlust der Wirkung des Progesterons auf den ovinen Uterus *intra partum* liegt daher in erster Linie nicht im Abfall der peripheren Konzentration begründet, sondern lässt sich durch ein rapides Sinken der Rezeptorendichte im Myometrium erklären (KLAUKE und HOFFMANN, 1992).

Neben der Synthese des Progesterons erfolgt in der Plazenta des Schafes wie bei vielen anderen Haussäugetieren auch die Bildung von Östrogenen (BASSETT et al., 1969; HOFFMANN, 1993). Über nahezu den gesamten Verlauf der Trächtigkeit überwiegt die konjugierte Form dieser Steroide. Die freien Östrogene steigen in der Frühgravidität geringgradig an und bleiben danach auf einem gleichbleibend niedrigen Niveau (THORBURN et al., 1977). Der deutliche, präpartale Anstieg des freien Östradiol-17 $\beta$  mit einem intrapartalen Maximum beginnt beim Schaf 48 bis 24 Stunden *ante partum* (a.p.), während dieser bei der Ziege bereits 4 - 5 Tage a.p. zu beobachten ist (THORBURN et al., 1977; SOBIRAJ et al., 1986).

Auch die Expressionsrate des Östrogenrezeptors  $\alpha$  im graviden Uterus unterliegt nur geringfügigen Schwankungen. Im letzten Drittel der Trächtigkeit besteht beim Schaf ein konstantes Expressionsniveau, welches erst mit dem präpartalen Ansteigen des Kortisolspiegels drastisch zunimmt (WU et al., 1995; LEUNG et al., 1999).

#### **2.4. Physiologische Veränderungen der vaginalen und zervikalen Strukturen während der Gravidität und der Geburt beim Schaf**

Während der im Mittel  $150 \pm 5$  Tage dauernden Gravidität (BOSTEDT, 1996a) gestalten sich nicht nur die mechanischen und physikalischen Eigenschaften der Reproduktionsorgane des Schafes um, sondern auch deren biochemischer und histologischer Aufbau.

Anders als über die graviditätsbedingten Veränderungen von Uterus und Zervix besteht über die zeitgleich ablaufenden Vorgänge in der Vagina bei den Haussäugetieren noch weitgehend Unkenntnis.

Die wenigen Angaben über makroskopische Veränderungen der Vagina beziehen sich auf die letzten Tage *ante partum*, da sich die Vorgänge in der Frühträchtigkeit nur schwer visualisieren lassen. Unter dem zunehmenden Einfluß der plazentären Östrogene tritt gegen Ende der Gravidität eine allgemein zu beobachtende Ödematisierung von Vagina und Vulva ein, die bei Primiparen besonders ausgeprägt sein kann (HARTWIG, 1993; RÜSSE und GRUNERT, 1993). Primärliteratur über weitere speziesspezifische Veränderungen vaginaler Strukturen beim Schaf fehlt.

Hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften berichtet McCLEAN (1956) von einer erheblichen Zunahme der passiven Dehnbarkeit der Vaginalwand innerhalb des letzten Trächtigkeitsdrittels. Andere Autoren konnten diese Beobachtungen bestätigen. AYEN et al. (1998) führten Messungen des vaginalen Fassungsvermögens sowie der Reaktion der Vaginalwand auf einen plötzlichen Druckanstieg bei graviden und ingraviden Schafen durch, um Informationen über die Dehnungsfähigkeit des vaginalen Gewebes zu erhalten. Für die Untersuchung an den narkotisierten Probanden fand ein mit körperwarmer Kochsalzlösung befüllbares Ballonkathetersystem Verwendung. Zur Bestimmung des Grundtonus der Vaginalwand wurde das Fassungsvermögen des Scheidenkanals bis zum Erreichen des atmosphärischen Drucks herangezogen. Je größer dieses Flüssigkeitsvolumen ausfiel, desto niedriger war die entgegengesetzte Grundspannung der Vaginalwand einzuschätzen. Als weiterer Parameter wurde das Verhalten des Scheidengewebes bei einer plötzlichen Druckerhöhung durch eine additive Instillation von 20 % des ermittelten Fassungsvermögens bestimmt. Je höher die maximalen Druckverhältnisse waren, desto geringer erfolgte die Dehnungsreaktion auf diesen plötzlichen, dilatativen Reiz. Diese Größe wurde als *Compliance* definiert. Bei graviden Schafen fand bis zum 90. Tag der Trächtigkeit eine stetige Zunahme des vaginalen Fassungsvermögens gekoppelt mit einer Reduktion der *Compliance* der Scheidenwand statt. Beide Meßgrößen stagnierten bis zur Geburt auf gleichem Niveau. Unmittelbar vor dem Partus war eine moderate Steigerung der *Compliance*



zu beobachten, parallel dazu erreichte der Plasmaöstrogenspiegel sein Maximum. Die über einen längeren Zeitraum der Trächtigkeit verminderte *Compliance* könnte folgendermaßen erklärbar sein: Aufgrund eines geringeren Grundtonus der Vaginalwand, gekennzeichnet durch das erhöhte Fassungsvermögen, ist die physiologisch begrenzte, absolute Dehnungsfähigkeit des Scheidengewebes bereits unter atmosphärischen Verhältnissen beinahe ausgeschöpft. Andererseits könnten auch hormonelle Einflüsse eine Rolle spielen. Um dies zu überprüfen, wurden denselben Probanden in der folgenden Gravidität exogene Östrogene und Progesteron verabreicht. Die zuvor beobachtete Erniedrigung der vaginalen *Compliance* war nach beiden Hormonapplikationen noch deutlicher ausgeprägt. Das unter dem Einfluß des Östradiol erhöhte vaginale Fassungsvermögen prägte sich bei den tragenden Schafen markanter aus, als bei den ingraviden Probanden. Zur Verifizierung der hormonellen Effekte wurden auch ovariectomisierte Tiere analog behandelt. Durch die exogen zugeführten Hormone ließen sich ähnliche Veränderungen in der Reaktion der Scheidenwand erzielen, was eine direkte Wirkung von Steroidhormonen auf die mechanischen Eigenschaften des Vaginalgewebes nahelegt.

Histologisch konnte MITCHELL (1972) Unterschiede in der Morphologie des Vaginalepithels gravider und ingravider Schafe aufzeigen. Er verglich hierzu Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Vaginalbiopsate eines zyklischen, nicht-trächtigen Tieres mit Gewebeproben von frühgraviden Schafen zwischen dem 1. und 70. Tag der Trächtigkeit. Im ingraviden Zustand wies das Vaginalepithel einen mehrschichtigen Aufbau auf. Die Epithelzellen färbten sich gleichmäßig an und waren in den unteren und mittleren Schichten squamös geformt. Die oberflächliche Schicht wich von dieser Form ab und stellte sich stark abgeflacht dar. Die auffälligste Veränderung innerhalb der ersten 50 Gestationstage war in der zunehmenden Vergrößerung der obersten Zellschicht zu sehen, die sich mit einem Maximum um den 45. Tag aus gleichmäßig angeordneten, kubiodalen Epithelzellen zusammengesetzte. Mit weiterem Fortschritt der Trächtigkeit flachten die oberflächlichen Zellen wieder langsam ab. Nach dem 55. Tag der Gravidität konnte eine Reduktion der Zellschichten beobachtet werden. In vielen Fällen wiesen die Zellkerne kleinste Vakuolen auf, das Zytoplasma färbte sich insgesamt schwächer an als im ingraviden Zustand.

Andere Autoren beschäftigten sich mit der lichtmikroskopischen Analyse des Kollagengehalts und der Verteilung der Kollagenfasern in der Vaginalwand des Schafes während der Gravidität. So untersuchten AYEN und NOAKES (1998) Biopate der Vaginalwand von Schlachttieren. Eine Gruppe umfaßte ingravide Schafe. In die Gruppe 2 wurden Tiere aufgenommen, die 30 bis 143 Tage trächtig waren. Jeweils 6 Proben aus unterschiedlichen Regionen der Vagina wurden mit einer histologischen Methode gefärbt, die kollagenes Bindegewebe von anderen Fasern farblich hervorhebt (van GIESON). Folgende Parameter wurden ausgewertet: Verteilung der kollagenen Fasern innerhalb der Vagina eines Tieres, Vergleich des Kollagengehalts zwischen den Gruppen. Bei keinem Tier ließen sich Variationen in der Verteilung der Kollagenfasern an verschiedenen Lokalisationen in der Vaginalwand darstellen. Des weiteren zeigte sich lichtmikroskopisch, daß der Gehalt an Kollagen innerhalb der ersten 60 Tage der Trächtigkeit geringgradig gegenüber dem ingraviden Zustand ansteigt, danach jedoch wieder absinkt und bis zur Geburt hin nahezu gleich bleibt. Die Autoren gaben jedoch zu bedenken, daß die Lichtmikroskopie nur bedingt geeignet ist, um geringste Veränderungen im Kollagengehalt zu identifizieren. Für eine exaktere Bestimmung wäre eine Messung des Hydroxyprolinegehaltes in lysierten Gewebeproben notwendig, die in der genannten Studie jedoch keine Anwendung fand.

Die einzige Arbeit, in der graviditätsbedingte, histologisch erkennbare Veränderungen in tieferen Schichten der Vaginalwand detaillierter beschrieben werden, stammt aus der Humanmedizin. MANABE und YOSHIDA (1986) verglichen Vaginalbiopate von Frauen während des normalen Zyklusgeschehens mit solchen von Probandinnen während unterschiedlicher Zeitpunkte in der Schwangerschaft (mittleres und letztes Trimester). Eine weitere Gruppe umfaßte Patientinnen, die sich in einem Zeitraum bis zu 30 Minuten p.p. befanden. Bei der licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchung ließ sich in den Biopaten der ingraviden Probandinnen das mehrschichtige Plattenepithel, die *Lamina propria mucosae* und die darunter liegende Muskelschicht gut differenzieren. Die kollagenen Fasern der *Lamina propria mucosae* erschienen dicht gepackt und parallel angeordnet. Leukozyten waren nicht nachweisbar. Von der Mitte der Schwangerschaft bis zum Geburtszeitpunkt fand eine Ödematisierung und Auflockerung des vaginalen Bindegewebes durch eine Zunahme der amorphen Grundsubstanz statt. Die geordnete Strukturierung des Faserverbands und die parallele Anordnung der

Fasern lockerte sich mit Fortschreiten der Schwangerschaft auf und war besonders in der Gruppe p.p. stark verringert. Weiterhin fanden sich Bezirke mit dünneren Kollagenfasern, die bevorzugt in der direkten Umgebung zu den Fibroblasten standen. Die Autoren führten dies auf die Wirkung kollagenolytischer Produkte aus ortsansässigen Bindegewebszellen zurück. Innerhalb der Fibroblasten konnte während der Gravidität eine Zunahme an lipophilen Granula registriert werden. Als Inhalt dieser Granula wurden Prostaglandine vermutet, denen eine kollagenolytische Eigenschaft zugeschrieben wird. Perivaskulär bestanden im Vergleich zur ingraviden Kontrollgruppe nur minimale Veränderungen des kollagenen Gewebes. Infiltrationen des vaginalen Stromas mit Leukozyten traten nicht in Erscheinung, was eine Beteiligung dieser mobilen Zellen am peripartalen Abbauprozess des vaginalen Kollagen bei der Frau unwahrscheinlich erscheinen läßt.

Makroskopisch ist an der Zervix des Schafes im Verlauf der Gravidität eine stetige Größenzunahme auf bis zu 13 cm Länge und 3 cm Umfang kurz a.p. zu erkennen (AUGHEY et al., 1983). Ab dem 4. Graviditätsmonat kann zudem eine Erhöhung des Gewichts beobachtet werden (REGASSA und NOAKES, 2001). Da in verschiedenen Arbeiten kein signifikanter Anstieg des Wassergehaltes nachgewiesen werden konnte, sehen die Autoren die Ursachen für die Zunahme von Gewicht und Größe der Zervix in einer Änderung der biochemischen Zusammensetzung (AUGHEY et al., 1983; FOSANG et al., 1984; REGASSA und NOAKES, 2001).

Die Umstellung des zervikalen Stoffwechsels kann bereits ab der 8. Woche *post conceptionem* durch eine veränderte Proteinzusammensetzung des Mukus nachgewiesen werden. Bereits ein kurzes Erhitzen einer Zervikalschleimprobe führt zu einer Koagulation der Proteine, die an einer weißlich-trüben Verfärbung des Mukus erkennbar wird. Da dieses Phänomen nur bei graviden Schafen auftritt, wurde die Methode vor der routinemäßigen Etablierung der Sonographie zur Trächtigkeitsdiagnostik verwandt (BOSTEDT et al., 1972).

Hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften können Ähnlichkeiten zu den Verhältnissen in der Vagina während der Gravidität festgestellt werden. Zwar wird die Konsistenz des Organs mit Fortschreiten der Trächtigkeit weicher, die maximale Dehnbarkeit nimmt dafür kontinuierlich ab (OWINY et al., 1991).

Von besonderem Interesse sind die Reifungsvorgänge, die um den Geburtszeitpunkt zu einer Erweichung des Gewebes führen und letztendlich die Passage des Fetus ermöglichen. Da bei Schafen der Bindegewebsanteil über 80 % liegt (SCHUH, 1993), mündet eine Störung dieses zervikalen *Softenings* bei dieser Spezies in den meisten Fällen aufgrund einer mangelhaften Öffnung des weichen Geburtsweges in eine Dystokie (SOBIRAJ, 1994). Histologisch können in der ovinen Zervix bereits in den letzten 10 Tagen der Gravidität eine Auflockerung der kollagenen Bindegewebsstrukturen mit einer Zunahme der Grundsubstanz und der Fibroblastenanzahl beobachtet werden (AUGHEY et al., 1983; FOSANG et al., 1984). Im Rahmen der unmittelbar präpartal ablaufenden Zervixreifung spielt beim Schaf wie auch bei anderen Spezies die Einwanderung polymorphkerniger Leukozyten in die subepithelialen Regionen eine wichtige Rolle. Anders als bei Ratten, wo hauptsächlich Eosinophile Granulozyten in Erscheinung treten, überwiegen bei ovinen und humanen Infiltraten die Neutrophilen Granulozyten (JUNQUEIRA et al., 1980; LUQUE et al., 1996; LUQUE et al., 1997). Aufgrund ihres Gehaltes an Kollagenasen und Gelatinasen induzieren sie zum einen direkt den Abbau des Bindegewebes, können jedoch auch über Mediatoren lokal gebundene Kollagenasen aktivieren (OSMERS et al., 1992; OWINY et al., 1995). Die Wirkung der Kollagenasen führt zu einer vermehrten Löslichkeit des Kollagens mit einer Abnahme der reifen, stark vernetzten Fasern (FOSANG et al., 1984). Als verantwortliche Enzyme dieser Degradierung des Kollagens wiesen HASHIZUME und Mitarbeiter (1997) im bovinen Uterus zinkabhängige Matrixmetalloproteinasen nach.

Der Einfluß der Steroidhormone, insbesondere des Östrogens, auf die Zervixreifung bei Schafen ist Gegenstand einer elektronenmikroskopischen Studie von OWINY et al. (1987). Kurz vor dem Ende der Gravidität erhielten die Tiere östrogenhaltige Infusionen über eine Dauer von 14 - 24 Stunden. Einer Gruppe wurde zusätzlich ein Inhibitor der Prostaglandinsynthese verabreicht. Die Probanden wurden nach Abschluß der Behandlung geschlachtet und die Morphologie des zervikalen, kollagenen Bindegewebes mit einem Raster-Elektronenmikroskop untersucht. Zur Kontrolle der peripheren Hormonspiegel wurden in regelmäßigen Intervallen venöse Blutproben entnommen. Durch die präpartalen Infusionen von Östradiol-17 $\beta$  konnten bei gleichbleibendem Progesteronspiegel bei allen Tieren ein vorzeitiges zervikales

*Softening* ausgelöst werden. Dieses Phänomen drückte sich histologisch in einer Lockerung des kollagenen Netzwerkes mit einer Zunahme der amorphen Grundsubstanz aus, die in der unbehandelten Kontrollgruppe fehlte und bei Schafen p.p. am deutlichsten ausfiel. Des weiteren wurde die unterstützende Wirkung von Prostaglandinen an diesem Reifungsprozeß belegt, da bei den Probanden mit der additiven Verabreichung des Prostaglandin-Inhibitors das östrogeninduzierte Softening der Zervix signifikant geringer ausfiel als bei den Kontrolltieren.

Welche mechanischen und biochemischen Vorgänge zu einer Erweichung der vaginalen Wandstrukturen im unmittelbaren Geburtszeitraum führen, die einen Durchtritt der Feten durch den *Canalis vaginalis* erlauben, sind für die Haussäugetiere bislang noch nicht eindeutig wissenschaftlich belegt.

## **2.5. *Prolapsus vaginae ante partum* beim Schaf**

### **2.5.1. Wesen und Vorkommen des *Prolapsus vaginae ante partum***

Der *Prolapsus vaginae* beschreibt einen Zustand, bei dem Teile der Vaginalwand in das Lumen des *Canalis vaginalis* eingestülpt sind und in der *Rima vulvae* sichtbar werden. Nach klinischen Gesichtspunkten sind die verschiedenen Formen des Vaginalprolaps einerseits hinsichtlich der selbständigen Reposition, andererseits anhand der sichtbaren, verlagerten Anteile zu differenzieren. Besteht der Vorfall lediglich temporär im Liegen, wird dieser als habitueLLer Prolaps bezeichnet. Ein stationärer Scheidenvorfall besteht, wenn durch das Aufstehen des Tieres keine selbständige Reposition mehr erfolgt. Ein partieller oder inkompletter *Prolapsus vaginae* liegt bei nur teilweiser Verlagerung der Scheidenwand vor. Ein kompletter oder totaler Scheidenvorfall ist durch ein Hervortreten der *Portio cervicis* aus der *Rima vulvae* gekennzeichnet (BICKHARDT, 1993; DE BOIS und VAN DER WEIJDEN, 1993; BOSTEDT, 1996b).

Ein Vaginalprolaps kommt hauptsächlich bei graviden Tieren vor. Er kann aber auch unter der Geburt entstehen. In der Regel ist diese Erkrankung beim Schaf überwiegend im letzten Drittel der Gestation zu beobachten, gefolgt von Fällen eines *Prolapsus vaginae intra partum*; ein Auftreten bei ingraviden Tieren ist sehr selten (BICKHARDT, 1993; DE BOIS und VAN DER WEIJDEN, 1993; BOSTEDT, 1996b). In einer eigenen, retrospektiven Studie konnten die Angaben von SOBIRAJ (1990) über die zeitliche Beziehung zwischen dem ersten Auftreten eines *Prolapsus vaginae* und dem Partus bestätigt und ergänzt werden: Im Mittel waren erste Symptome eines Vaginalprolaps 11 Tage a.p. zu beobachten. Die minimalste Zeitspanne bis zum Eintritt der Geburt betrug 24 Stunden, das Maximum lag bei 42 Tagen. Innerhalb der letzten 10 Gestationstage wurden 62 % der Erstbeobachtungen gemacht, während nur 12 % der betroffenen Schafe früher als 21 Tage a.p. erkrankten (KLOSS et al., 2002).

Bei einem speziesübergreifenden Vergleich stellt sich die besondere Bedeutung dieser Graviditätsstörung beim Schaf heraus. So werden bei allen anderen Haussäugetieren lediglich seltene bis sporadische Fälle beschrieben (DE BOIS und VAN DER WEIJDEN, 1993). Für englische und australische Schafbestände ergaben verschiedenen Erhebungen ein mittleres Auftreten von 0,1 - 1 %, während die Inzidenz in einzelnen Herden über 15 % betragen kann (EDGAR, 1952; LOW und SUTHERLAND, 1987). Eine schweizerische Studie an Ziegen läßt keine Ableitung einer generellen Disposition des kleinen Wiederkäuers für diese Erkrankung zu, da bei 1204 Geburten aus verschiedenen Beständen lediglich 19 Fälle eines *Prolapsus vaginae* zu beobachten waren (EITEL, 1990).

### **2.5.2. Ätiologie und Pathogenese des ovinen *Prolapsus vaginae ante partum***

Trotz der zahlreichen Studien zum *Prolapsus vaginae ante partum* beim Schaf ist eine zufriedenstellende Erklärung der Pathogenese bislang nicht möglich. Die verschiedenen Ergebnisse erlauben jedoch die Annahme, daß es sich bei dieser antepartalen Störung um ein multifaktorielles Geschehen handeln muß, das im wesentlichen durch zwei Grundprobleme gekennzeichnet ist: Einerseits spielt die Erschlaffung des vaginalen und perivaginalen Gewebes eine Rolle, andererseits

kommt erhöhten abdominalen Druckverhältnissen gegen Ende der Gestation eine besondere Bedeutung zu (BUSCH, 2001).

In einer Übersichtsarbeit von McCLEAN (1956) wurden folgende globale Faktoren als Prädispositionen diskutiert: Erbliche Einflüsse, eine subklinische Hypokalzämie, Imbalancen in der Steroidhormonregulation, eine erhöhte Menge an Phytoöstrogenen im Futter, Mängel in der Körperkonstitution und eine Altersabhängigkeit. Weitere prädisponierende Einflüsse sollen Weiden in Hanglagen, Mehrlingsträchtigkeiten sowie eine hohe Aufnahme von Rauhfutter minderer Qualität darstellen, die zu einer Erhöhung der intraabdominalen Druckverhältnisse insbesondere in der späten Gravidität führten, sein.

In verschiedenen Studien ließen sich im Serum von Schafen mit einem antepartalen Scheidenvorfall subnormale periphere Kalziumkonzentrationen nachweisen, ohne daß klinische Symptome einer Hypokalzämie bei den betroffenen Individuen beobachtet werden konnten (STUBBINGS, 1971; SOBIRAJ et al., 1986). Da Kalziumionen eine wichtige Rolle bei der Kontraktion glatter und quergestreifter Muskulatur spielen, könnte eine Erniedrigung ihrer Konzentration auf zellulärer Ebene bereits negative Auswirkungen auf die Stabilität der Vaginalwand haben, bevor klinisch erfaßbare Symptome wie Bewegungsstörungen oder gar eine Paralyse des Tieres in Erscheinung treten. Dem widerspricht eine andere Untersuchung, in der keine Differenz im Kalziumhaushalt zwischen gesunden, spätgraviden Tieren und Schafen mit einem *Prolapsus vaginae ante partum* ermittelt werden konnten (HOFMANN, 1998). HOSIE und Mitarbeiter (1991) identifizierten in ihrer Studie in betroffenen Herden sowohl hypokalzämische als auch normokalzämische Probanden, wodurch eine Hypokalzämie als alleiniger Faktor wenig wahrscheinlich erscheint.

Auch die Angaben auf endokrinologischer Ebene geben keine eindeutigen Ergebnisse wieder. So zeigte sich in einer Untersuchung von SOBIRAJ et al. (1986), daß betroffene Schafe einen tendenziell höheren antepartalen Plasmaspiegel an Progesteron und Östradiol-17 $\beta$  aufwiesen als Tiere mit einer ungestörten Gravidität. Eine statistische Signifikanz war jedoch nicht gegeben. HOFMANN (1998) bestätigte das höhere Niveau der Plasmaspiegel für Progesteron und Östradiol-17 $\beta$ , konnte

jedoch ebenfalls keinen statistisch belegbaren Unterschied zwischen betroffenen Tieren und der spätgraviden Kontrollgruppe feststellen. Auch die Konzentrationen des Estron und Estronsulphats im Plasma von Schafen mit einem *Prolapsus vaginae ante partum* zeigten keine signifikante Erhöhung. Diese Resultate belegen die Annahme einer Imbalance im Steroidhormonhaushalt, sprechen jedoch nicht für das Vorliegen eines generellen „Hyperöstrogenismus“. AYEN und Mitarbeiter (1998) erzeugten in ihren Untersuchungen über die Auswirkungen von Progesteron und Östradiol auf die mechanischen Eigenschaften des Vaginalkanals durch parenterale Applikation beider Hormone zwar im Vergleich zu den physiologischen Werten in der Trächtigkeit deutlich höhere periphere Konzentrationen beider Steroide, ein *Prolapsus vaginae ante partum* trat jedoch bei keinem der Probanden auf.

In einer histologischen Studie, die sich mit dem Kollagengehalt des vaginalen Bindegewebes beschäftigte, wurde ein lichtmikroskopischer Vergleich von Vaginalbiopsaten gesunder Tiere und solchen Schafen, die in der vorangegangenen Trächtigkeit einen *Prolapsus vaginae ante partum* zeigten, durchgeführt (AYEN und NOAKES, 1998). Es ließen sich keine Differenzen in der Kollagenverteilung zwischen beiden Gruppen nachweisen. Hierbei unterschieden sich die beiden Kollektive lediglich durch einen geringgradig erhöhten Gesamtkollagengehalt bei den Schafen nach einem *Prolapsus vaginae*. Die Autoren nahmen an, daß dieses Phänomen möglicherweise auf eine ausgeheilte Vaginitis im Rahmen des vorausgegangenen Prolapsgeschehens zurückzuführen ist. Ein direkter Vergleich von aktuell betroffenen Schafen mit gesunden Tieren erfolgte in dieser Studie nicht.

Bezüglich einer Rassedisposition berichten LOW und SUTHERLAND (1987) von einer erhöhten Erkrankungsrate bei Kreuzungstieren aus „Suffolk“ und „Greyface“ in Schottland. Für Mitteleuropa und Australien konnten zahlreiche Autoren jedoch keine Bevorzugung einer bestimmten Rasse belegen (EDGAR, 1952; SOBIRAJ, 1990; HOFMANN, 1998; KLOSS et al., 2002).

Jüngere Untersuchungen wiesen zudem nach, daß, entgegen der bisherigen Annahme einer erhöhten Erkrankungsrate bei älteren Tieren, gerade Erstlingsschafe zu einem hohen Anteil betroffen waren (SOBIRAJ, 1990; KLOSS et al., 2002). In beiden Untersuchungen lag der prozentuale Anteil von *Primi-* und *Secundoparae*



zusammengenommen über der Hälfte aller betroffenen Tiere. Schafe in der dritten Gravidität und mehr bildeten einen Anteil von 40 % (KLOSS et al., 2002) beziehungsweise 48 % (SOBIRAJ, 1990).

Die Auswirkungen der Fütterung mit verschiedenen Anteilen an Rohfaser und verwertbarer Energie sowie der Einfluß des Ernährungszustands von Schafen mit antepartalem Vaginalprolaps wurden von HOSIE und Mitarbeitern (1991) untersucht. Sie verglichen die Rationen und den Ernährungszustand der Tiere in verschiedenen Herden, die sich durch die Inzidenz an Prolapsfällen unterschieden. Ein Einfluß der Fütterung auf die Quote erkrankter Schafe war nicht festzustellen. In Beständen mit einer jährlichen Inzidenz von > 3 % fielen insgesamt mehr Tiere in Mastkondition auf als in Herden mit geringerer Erkrankungsrate (< 1 % pro Jahr). Eine Überfütterung der graviden Schafe scheint somit einen prädisponierenden Faktor darzustellen.

Hereditäre Einflüsse werden seit längerem vermutet (EDGAR, 1952). Auf welcher Ebene diese bestehen ist jedoch noch unerforscht. Ein Hindernis stellt die Tatsache dar, daß viele Schäfer betroffene Tiere nicht wieder zur Zucht zulassen und nicht selten auch die Nachzucht merzen, so daß sich retrospektive Auswertungen über die Vererbung schwierig gestalten.

### **2.5.3. Diagnostik, Therapie und Folgen eines *Prolapsus vaginae ante partum***

Wegen des markanten klinischen Bildes eines *Prolapsus vaginae* beim Schaf bereitet die Erkennung dieser vorgeburtlichen Störung *in praxi* kaum Schwierigkeiten. Als Differentialdiagnosen kommen dennoch folgende Erkrankungen in Betracht:

- Dystokie mit sekundärem *Prolapsus vaginae intra partum*
- *Inversio et Prolapsus vesicae urinariae* (BOSTEDT, 1996b)
- Tumore im Vestibulovaginalbereich
- Zysten der Bartholinischen Drüsen
- Perinealhernie (BLEUL und HAUSER, 1998)

Das Therapiekonzept eines antepartalen *Prolapsus vaginae* gestaltet sich rein symptomatisch. Um den bei den betroffenen Schafen ausgeprägten Preßreiz zu verhindern, werden in der Literatur verschiedene Methoden empfohlen, die sich vor allem in der Wirkungsdauer unterscheiden. Das unter Praxisbedingungen gebräuchlichste Verfahren stellt die lumbosakrale Epiduralanästhesie mit einem 2 %igen Lokalanästhetikum dar (BOSTEDT, 1988; BICKHARDT, 1993; NOAKES, 2001). Weitere Methoden, die sich durch eine verlängerte Dauer der Anästhesie auszeichnen, sind die von HERTRAMPF und Mitarbeitern (1978) beschriebene paravertebrale Leitungsanästhesie oder die sakrokokzygeale Extraduralanästhesie mit Alkohol (BOLLWAHN und SCHWESIG, 1987), ferner die Epiduralanästhesie mit einer Kombination aus Xylazin und Lidocain (SCOTT et al., 1995).

Bei der Prolapsreposition ist zu beachten, daß es häufig durch ein Abknicken der *Urethra* zu einem Harnstau kommt, wodurch die stark gefüllte Harnblase ein Hindernis bei der Rückverlagerung darstellen kann (BOSTEDT, 1996b; NOAKES, 2001). Sonographische Untersuchungen haben gezeigt, daß zur Entleerung der Harnblase eine blinde Punktion durch das vorgefallene Vaginalgewebe hindurch abzulehnen ist, da nicht selten Teile des Uterus mit in den Prolaps einbezogen sind (SCOTT und GESSERT, 1998).

In einer vergleichenden Studie konnten RÜSCH und BERCHTOLD (1978) belegen, daß eine einmalige Reposition des Scheidengewebes meist keinen dauerhaften Therapieerfolg sichert, sondern daß das Anlegen eines Scheidenverschlusses als Rezidivprophylaxe notwendig ist. Allgemein anerkannte Verfahren stellen chirurgische Scheidenverschlüsse nach BÜHNER (1958) oder mittels Tabaksbeutelnaht, U-Naht sowie der Flessaverschluß dar (RÜSCH und BERCHTOLD, 1978). Bei leichteren Fällen fanden nicht-invasive vaginale Einlagen in Form eines „Schafretters“ respektive „Retrainers“ oder perivaginal angelegte Bandagen Anwendung (FOWLER und EVANS, 1957; RÜSCH und BERCHTOLD, 1978). Die aufwendige Methode eines artifiziellen Pneumoperitoneums fand keinen Eingang in die Praxis (HARTIGAN, 1961).

Trotz frühzeitig erfolgter Behandlung treten bei einem Teil der Patienten Komplikationen in der laufenden Gravidität auf. In der Mehrzahl der Fälle handelt es

sich um einen therapieresistenten Preßreiz, der zu einem Ausreißen des Vaginalverschlusses oder zu einem Vorfall von Rektumschleimhaut führen kann. Aufgrund bestehender Reizungen und Entzündungen der Vaginalschleimhaut kann es durch aufsteigende Infektionen zu einem Absterben der Feten kommen. Des weiteren können persistierende Harnabsatzprobleme bestehen (BICKHARDT, 1993; BOSTEDT, 1996b). KNOTTNEBELT (1988) berichtete von fünf Fällen einer Vaginalruptur nach unbehandeltem *Prolapsus vaginae ante partum*.

Eine weitere Folge des vorgeburtlichen Vaginalprolaps stellt das gehäufte Auftreten einer Dystokie dar, wobei die Angaben in der Literatur zwischen 58 % und 75 % der betroffenen Tiere schwanken (Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1      Anteil an Dystokiefällen bei Schafen nach *Prolapsus vaginae ante partum* nach verschiedenen Autoren

Autor	Schafe mit Dystokie (%)
RÜSCH und BERCHTOLD (1978)	61,2
SOBIRAJ (1990)	73,5
BOSTEDT (1996b)	60 - 75
KLOSS et al. (2002)	58,0

In diesen Arbeiten lag den Geburtsstörungen in der Mehrzahl der Fälle eine mangelhafte Öffnung des weichen Geburtsweges in Form einer Zervixmanschette zugrunde.

Ein Vergleich der perinatalen Lämmersterblichkeit zeigt, daß diese bei Mutterschafen nach einem antepartalen *Prolapsus vaginae* deutlich erhöht ist. RÜSCH und BERCHTOLD (1978) geben für Normalgeburten nach ungestörter Gravidität 8 % Totgeburten respektive Todesfälle innerhalb der ersten 24 Lebensstunden an. In ihrer Untersuchung über den Geburtsverlauf bei Schafen mit antepartalem Vaginalprolaps belief sich die Lämmersterblichkeit auf 30 %. Auch SOBIRAJ (1990)

berichtete von einer perinatalen Todesrate, die bei 29 % lag, und somit die Angaben von RÜSCH und BERCHTOLD (1978) bestätigte.

Hinsichtlich der Rezidivgefahr in folgenden Trächtigkeiten ist eine generelle Prognose nur schwer zu stellen, da betroffene Schafe nicht selten von einer weiteren Zuchtnutzung ausgeschlossen werden. Einzelne Autoren berichten jedoch von Rezidivraten von bis zu 40 % (HOSIE, 1989; AYEN und NOAKES, 1997). In beiden Studien stand als Probandengruppe jedoch nur eine einzelne Herde beziehungsweise 18 Schafe zur Verfügung, was eine kritiklose Übertragung der Ergebnisse auf die Gesamtpopulation fraglich erscheinen läßt.

### 3. MATERIAL UND METHODIK

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Tierkollektiv

Das Gesamtkollektiv umfaßte 15 Tiere, wovon 11 Probanden gravid waren und vier Schafe *intra partum* (i.p.), unmittelbar nach Expulsion des letzten Lammes zur Verfügung standen. Die Tiere gehörten der Rassen Merino Landschaf (n = 8), Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf (DSK) (n = 5), Suffolk (n = 1) und Kamerunschaf (n = 1) an. Ihr Alter schwankte zwischen 1 und 5 Jahren, wobei sich ein mittleres Alter von  $3,2 \pm 1,4$  Jahren ergab. Die Identifikation der Probanden erfolgte anhand der Betriebsnummern, bei mehreren Tieren eines Bestandes zusätzlich anhand der Stalohrmarken.

##### 3.1.2. Gruppeneinteilung

Für die Untersuchungen bestand aufgrund der Themenstellung die Notwendigkeit, im voraus eine Gruppeneinteilung vorzunehmen. Es wurden folgende Kollektive gebildet:

- Schafe mit intakter, ungestörter Gravidität (n = 5)
- Schafe *intra partum* (n = 4)
- Schafe mit einem *Prolapsus vaginae ante partum* (n = 6)

Die Gruppe 1 umfaßte fünf Schafe im Alter von  $3,2 \pm 1,6$  Jahren aus dem geschlossenen Bestand der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz der Justus-Liebig-Universität Gießen und wiesen eine ungestörte, fortgeschrittene Trächtigkeit auf. Sie bildeten die

Kontrollgruppe und dienten dazu, die physiologischen Verhältnisse in der Spätgravidität aufzuzeigen. In die Ermittlung des erwarteten Geburtstermins flossen das Deckdatum, die Ergebnisse der klinisch-gynäkologischen Untersuchung sowie der B-Mode Real-Time-Sonographie in Anlehnung an die von KAULFUSS et al. (1998) beschriebene Methode zur Altersschätzung der Feten ein. Nach Abklärung des Standes der Gravidität geschah die Probenentnahme in der Weise, daß sie auf die letzten 21-14 Tage a.p. entfiel.

Als Vergleichskollektiv für die Veränderungen *intra partum* dienten vier gesunde Schafe im Alter von  $3,5 \pm 1,3$  Jahren direkt nach der komplikationslosen Austreibung des letzten Lammes, welche die Gruppe 2 bildeten.

Für die Gruppe 3 standen weitere sechs Mutterschafe im Alter von  $3,0 \pm 1,5$  Jahren zur Verfügung, die an einem *Prolapsus vaginae ante partum* erkrankt waren. Diese Patienten entstammten verschiedenen Betrieben des Einzugsgebietes der Klinik.

Die Rassen- und Altersverteilung sowie die Graviditätsziffer innerhalb der einzelnen Gruppen sind Tabelle 3.1.1, Tabelle 3.1.2 und Tabelle 3.1.3 zu entnehmen. Es zeigt sich, daß alle Probandengruppen altersmäßig adäquat zusammengesetzt waren. Dies erschien für die Auswertung der Daten von Wichtigkeit, da insbesondere der Alterseinfluß auf die untersuchten Gewebestrukturen somit vernachlässigt werden konnte.

Tabelle 3.1.1: Verteilung der verschiedenen Rassen innerhalb der Probandengruppen.

Rasse	Gruppe		
	1	2	3
	Gravide, gesunde Schafe	Tiere i.p.	Patienten mit einem <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.
Merino Landschaf	3	2	3
DSK	2	2	1
Suffolk	--	--	1
Kamerunschaf	--	--	1

Tabelle 3.1.2: Alter der zur Verfügung stehenden Schafe unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit. Angabe der Einzelwerte und des arithmetischen Mittelwertes ( $\bar{x}_a$ ) und der Standardabweichung (SD).

Alter	Gruppe		
	1	2	3
	Gravide, gesunde Schafe	Tiere i.p.	Patienten mit einem <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.
1 Jahr	1	--	1
2 Jahre	1	1	2
3 Jahre	--	1	--
4 Jahre	2	1	2
5 Jahre	1	1	1
$\bar{x}_a \pm SD$	$3,2 \pm 1,6$	$3,5 \pm 1,3$	$3,0 \pm 1,5$

Tabelle 3.1.3: Aktuelle Graviditätsziffer der zur Verfügung stehenden Schafe unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit.

Graviditäts- ziffer	Gruppe		
	1	2	3
	Gravide, gesunde Schafe	Tiere i.p.	Patienten mit einem <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.
1.	1	--	2
2.	1	1	1
3.	--	1	1
4.	2	1	1
5.	1	1	1
$\bar{x} \pm SD$	$3,2 \pm 1,6$	$3,5 \pm 1,3$	$2,7 \pm 1,6$

### 3.1.3. Unterbringung und Fütterung

Die Probanden wurden während des Aufenthalts in der Klinik in gut beleuchteten und frischluftversorgten Einzelboxen mit Stroheinstreu aufgestellt. Die Schafe erhielten Heu und Wasser zur freien Aufnahme. Zusätzlich wurde eine Kraftfuttermischung, die sich zu gleichen Teilen aus Hafer und getrockneten Zuckerrübenschnitzeln zusammensetzte, in einer bedarfsorientierten Menge von 1,0 - 1,5 kg pro Tier und Tag gefüttert. Das Mineralfutter stand über eine Leckschale<sup>1</sup> zur freien Aufnahme zur Verfügung.

### 3.1.4. Klinische Untersuchung der Probanden

Bei Einstellung der Probanden gliederte sich der Untersuchungsgang in eine klinische Allgemeinuntersuchung sowie eine klinisch-gynäkologische Untersuchung. Bei den präpartalen Schafen erfolgte zusätzlich eine sonographische Überprüfung der Intaktheit der Gravidität.

Die Allgemeinuntersuchung umfaßte die Erhebung folgender Vitalparameter: Allgemeinbefinden des Tieres, Ernährungszustand, rektal gemessene Körperinnentemperatur, Herz- und Atemfrequenz, Pansentätigkeit. Zusätzlich wurde zur Detektion einer Gestationsketose der Ketonkörpergehalt im Spontanharn getestet<sup>2</sup>.

Um eine genitale Erkrankung bei den Probanden der Kontrollgruppen auszuschließen, erfolgte zusätzlich eine klinisch-gynäkologische Untersuchung inklusive einer Vaginoskopie mittels Röhrenspekulum.

Patienten mit einem antepartalen Scheidenvorfall wiesen ausnahmslos einen stationären *Prolapsus vaginae* auf, der die Begutachtung der vorgefallenen Vaginalschleimhaut ohne weitere Hilfsmittel erlaubte. Bei dieser Gruppe erfolgte eine manuelle vaginale Untersuchung, um vorhandene Verletzungen zu detektieren und den Zervixschluß zu überprüfen.

---

<sup>1</sup> Lactina Phosca Block 5-15-5, RWZ Rhein Main e.G., Köln

<sup>2</sup> Aceton Reagenz Tabletten, Fa. WDT, Garbsen



Die Kontrolle der Gravidität wurde transabdominal mittels B-Mode Real-Time-Sonographie mit einem fahrbaren Ultraschallgerät<sup>3</sup> durchgeführt. Im Bereich des wolffreien Bezirks in der rechten Leistengegend wurde ein mit Kontaktgel<sup>4</sup> benetzter, konvexer 5 MHz Linearschallkopf positioniert. Die Sonde wurde behutsam von kaudal in Richtung kranial bewegt, um das Abdomen zu durchmustern. Aufgrund der fortgeschrittenen Gravidität gelang nur eine Teildarstellung des Uterus. In Fällen, in denen auf der rechten Seite aufgrund der Lage des Fetus *in utero* keine Herzsilhouette vorzufinden war, wurde analog im linken Leistenspalt verfahren. Als Zeichen einer intakten Trächtigkeit wurden folgenden Kriterien gewertet:

- Echofreies oder echoarmes Fruchtwasser
- Gleichmäßige Beschaffenheit der Plazentome mit intakter Randzone
- Fetale Herzfrequenz von > 120 Schlägen pro Minute (Min.)

Schafe mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. wurden stationär aufgenommen und nach dem folgenden Behandlungsregime versorgt:

- Lumbosakrale Epiduralanästhesie mit 3,0 ml einer 2 % igen Procainlösung<sup>5</sup>
- Säuberung des prolabierte Gewebes mit steriler, isotonischer Natrium-Chlorid-Lösung<sup>6</sup> und anschließende Reposition
- Anlegen eines Scheidenverschlusses nach BÜHNER<sup>7</sup> (1958)
- 5000 i.E. Tetanusserum<sup>8</sup> pro Tier *subcutan*
- 4 mg/kg Körpergewicht Oxytetracyclin<sup>9</sup> *subcutan* über 5 Tage, hierbei wurde das Körpergewicht geschätzt

---

<sup>3</sup> Sonoline Primus, Fa. Siemens, Erlangen

<sup>4</sup> Sonogel®, Fa. Sonogel, Bad Camberg

<sup>5</sup> Procasel®, Fa. Selectavet, Weyarn

<sup>6</sup> NaCl Lösung 0,9 %, Fa. Braun, Melsungen

<sup>7</sup> Bühnerband, Fa. WDT, Garbsen

<sup>8</sup> Tetanusserum®, Fa. WDT, Garbsen

<sup>9</sup> Terramycin 100®, Fa. Pfizer, Karlsruhe

Während des stationären Aufenthaltes erfolgte täglich eine klinische Allgemeinuntersuchung sowie ein Ketontest aus Spontanharn. Außerdem wurde analog zur Eingangsuntersuchung einmal pro Tag eine transabdominale Sonographie zur Trächtigkeitskontrolle durchgeführt, um frühzeitig Störungen der Gravidität erkennen und behandeln zu können. Die Geburt fand unter tierärztlicher Aufsicht statt. Nur bei Bedarf wurde Geburtshilfe geleistet.

## **3.2. Methodik**

### **3.2.1. Probenentnahme und Lagerung**

#### **3.2.1.1. Entnahme der venösen Blutproben**

Bei allen Tieren wurden Blutproben zur Ermittlung des hormonellen Status sowie der Situation des Elektrolythaushaltes entnommen. Nach Scheiteln des Vlieses und Desinfektion der Haut des Halses mit 70 %igem Ethanol wurde die digital gestaute *Vena jugularis* mit einer sterilen Einmalkanüle<sup>10</sup> punktiert und je 10 ml Blut in einem Ammonium-heparinisierten Plasmaröhrchen<sup>11</sup> sowie in einer Serum-Monovette<sup>12</sup> aufgefangen.

Das Blutplasma wurde unmittelbar nach der Entnahme 10 Min. in einer Kühlzentrifuge<sup>13</sup> bei 3000 Umdrehungen pro Minute (UpM) abzentrifugiert, dekantiert und anschließend der Bestimmung der Elektrolyt-Konzentrationen zugeführt. Das Serum wurde analog zum Plasma aus dem Vollblut gewonnen und lagerte bis zur hormonanalytischen Bearbeitung bei - 20 °C.

---

<sup>10</sup> Sterile Einmalkanüle (1,2 x 40 mm), Braun, Melsungen

<sup>11</sup> Sarstedt, Nümbrecht

<sup>12</sup> Sarstedt, Nümbrecht

<sup>13</sup> Rotixa KS, Hettrich

### 3.2.1.2. Entnahme von Vaginalgewebe

Zur Probenentnahme aus der Vagina<sup>14</sup> wurde eine etwa 20 cm lange Spezialschere mit kleiner Schneidefläche verwendet. Die biopsierte Stelle der Vaginalwand wurde anschließend sofort mit einer jodhaltigen Salbe<sup>15</sup> benetzt und sorgfaltshalber mittels einer resorbierbaren Nadel-Faden-Kombination<sup>16</sup> mit einem Einzelheft verschlossen.

Bei den Tieren der Gruppen 1 und 2 erfolgte die Entnahme des Gewebes unter vaginoskopischer Kontrolle aus den lateralen Bezirken der Vaginalwand etwa auf halber Strecke zwischen der Harnröhrenmündung und dem *Ostium uteri externum*. Das Vorgehen entsprach der üblichen Verfahrensweise bei einer Entfernung vaginaler Polypen oder tumorähnlichen Veränderungen.

Bei den erkrankten Schafen fand die Biopsie im Rahmen der chirurgischen Behandlung des Scheidenvorfalls aus dem prolabierte Vaginalgewebe statt. Auf die Auswahl makroskopisch unveränderter Areale wurde besonders geachtet, da in entzündetem Gewebe Degenerationsprozesse stattfinden, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen führen könnten.

Die Biopate mit einem Gewicht von 30 - 80 mg wurden für die molekularbiologische Untersuchung unmittelbar nach der Exzision in steriler, körperwarmer Natrium-Chlorid-Lösung<sup>17</sup> gewaschen, sodann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei - 70 °C gelagert.

Vor der Überführung der Biopsien für die Histologie (0,4 x 0,4 x 0,4 cm) in 4 %iges, neutral gepuffertes Formol nach LILLIE (1976) erfolgte eine Reinigung bei Raumtemperatur in Natrium-Phosphatpuffer, um Blutreste zu entfernen. Die Lagerung der Proben geschah bei + 4 °C bis zur weiteren Bearbeitung.

---

<sup>14</sup> angezeigt nach § 8a des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25.05.1998

<sup>15</sup> Vet Sept Salbe, Albrecht, Aulendorf

<sup>16</sup> Vicyl V311, 2 metric, Ethicon, Norderstedt

<sup>17</sup> NaCl Lösung 0,9%, Braun, Melsungen

### **3.2.2. Blutuntersuchungen**

#### **3.2.2.1. Bestimmung der Plasma-Elektrolytkonzentrationen**

Die Bestimmung der Blutplasma-Konzentrationen der Natriumionen fand in einer Elektrodenmessung<sup>18</sup> statt. Die photometrische Messung des anorganischen Phosphats und des Magnesiums erfolgte mit einem Testkit<sup>19</sup>. Die Konzentration an Gesamt-Kalzium wurde mit einem Flammenphotometer<sup>20</sup> analysiert.

#### **3.2.2.2. Endokrinologische Untersuchungen**

Die Bestimmung des Estradiol-17 $\beta$  erfolgte in einem radioimmunologischen Sequenztest (HOFFMANN et al., 1973). Für die Ermittlung der Progesteronkonzentration wurde die Methode der automatischen Chemilumineszens<sup>21</sup> verwendet (PAPA, 2001).

Die Probenaufbereitung und Messung führte das Laborpersonal der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie Groß- und Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen durch (Professur für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung II: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann).

---

<sup>18</sup> ABL System 615, Radiometer Medical, Kopenhagen

<sup>19</sup> Labor + Technik Lehmann, Berlin

<sup>19</sup> Photometer EPAC 6141, Eppendorf-Nether-Hinz GmbH, Hamburg

<sup>20</sup> Flammenphotometer EFOX 5053, Eppendorf-Nether-Hinz GmbH, Hamburg

<sup>21</sup> Chemilumineszenzgerät ACS:180, Bayer Diagnostics, Fernwald

### 3.2.3. Molekularbiologische Techniken

Die Expressionsraten der Boten-(messenger)-Ribonukleinsäure (mRNA) der Moleküle Kollagen I, Metalloproteinase 1, *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1* und des Östrogenrezeptors  $\alpha$  wurden mit Hilfe einer semiquantitativen Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) untersucht. In Abbildung 3.2.1 sind die einzelnen Arbeitsschritte schematisch dargestellt.

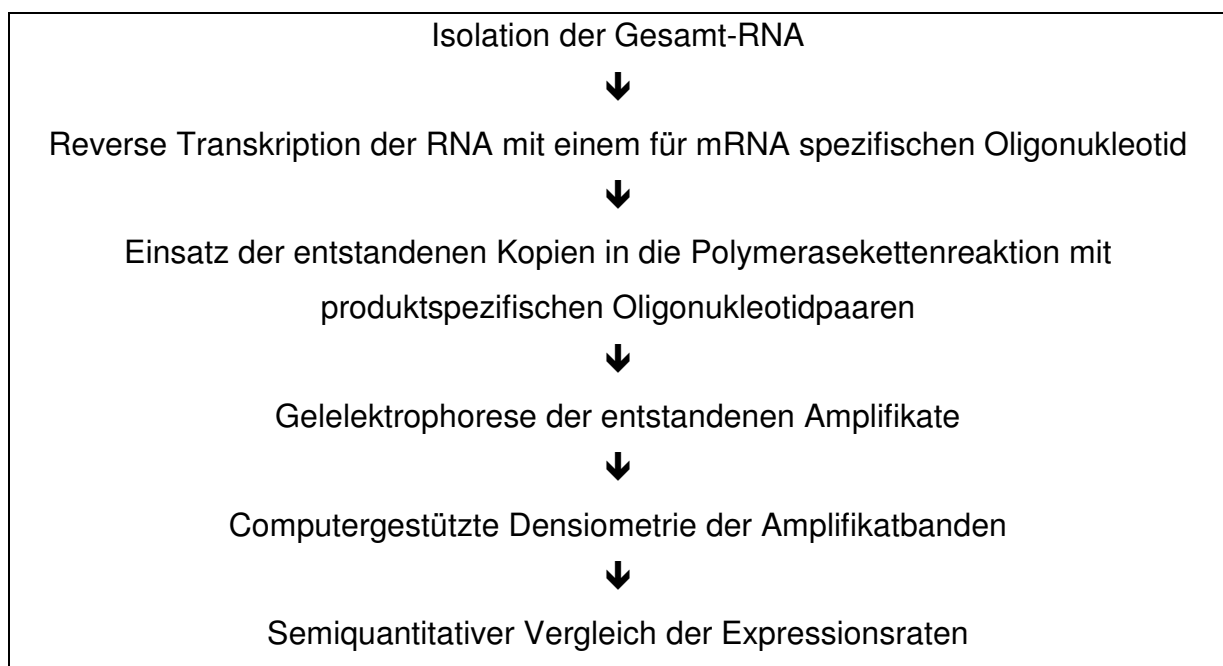


Abbildung 3.2.1: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte der semiquantitativen RT-PCR aus dem Vaginalgewebe von Schafen.

#### 3.2.3.1. Allgemeine Maßnahmen

Der Umgang mit RNA erforderte aufgrund ihrer Empfindlichkeit gegenüber ubiquitär vorhandener, RNA abbauender Enzyme (RNasen) eine besondere Sorgfalt. Um einen möglichst RNase-freien Arbeitsbereich zu gewährleisten, wurden bei allen Arbeitsschritten Latexhandschuhe getragen. Die Geräte und Lösungen bestanden entweder aus RNase-freien Materialien oder waren zuvor einer chemischen oder thermischen Dekontamination unterzogen worden. Im Innern des Spitzenschafes

enthielten die Pipettenspitzen zur Vermeidung einer Kontamination durch Aerosole einen Filter. Zur Reinigung und Dekontaminierung des Schneideaufsatzes des Homogenisators wurde dieser zu Beginn sowie zwischen jeder Probenaufbereitung nacheinander für mehrere Minuten in 4 N Natronlauge, 96 %iges Ethanol und Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-behandeltes Wasser getaucht. Die Durchführung der gesamten RNA-Isolation erfolgte bei einer Raumtemperatur von + 8 °C. Alle nachfolgenden Schritte geschahen bei einer Raumtemperatur von + 22 °C.

Um Pipettierfehlern vorzubeugen, wurde in den im folgenden beschriebenen Reaktionsschritten der DNase-Digestion, der Reversen Transkription (RT) und der PCR für alle Proben ein Mastermix der jeweils beschriebenen Ansätze unter Volumenzugabe von 10 % verwendet.

### **3.2.3.2. RNA-Isolation**

Aus den Biopaten der Vaginalschleimhaut wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNagents Total RNA Isolation Systems extrahiert. Diese Methode basiert auf der Denaturierung des Nukleinsäure-Protein-Komplexes durch eine Guanidin-Thiocyanat- und N-Lauryl-Sarcosin-haltige Denaturierungslösung mit einer anschließenden Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion. Hierbei treten Proteine, genomische DNA und andere Zellbestandteile in die organische Phase über, die RNA bleibt im wässrigen Überstand gelöst. Die RNA wird im nächsten Arbeitsschritt durch eine Fällungsreaktion mit Isopropanol extrahiert. Um eine Schädigung der empfindlichen RNA zu minimieren, erfolgte der gesamte Isolationsvorgang auf Eis. Das verkürzte, für die RT-PCR empfohlene Standardprotokoll des Herstellers wurde wie folgt in einigen Inkubationsschritten modifiziert, um die RNA-Ausbeute zu erhöhen:

- Grobe Zerteilung von 30-50 mg des tiefgefrorenen Gewebes in einem Mörser unter ständiger Kühlung durch flüssigen Stickstoff.
- Überführen des Gewebes in ein mit 600 µl Denaturierungslösung gefülltes, 2 ml fassendes Reaktionsgefäß und weitere mechanische Zerkleinerung und Homogenisierung.

- Zugabe von 60 µl 2 M Natrium-Azetat und 600 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, danach Vermischen durch 10 Sekunden (sek.) schütteln.
- Inkubation auf Eis für 15 Min.
- Zentrifugation bei 4 °C für 20 Min. (Geschwindigkeit: 10.000 x g).
- Vorsichtiges Überführen des RNA-haltigen, wäßrigen Überstands in ein neues Reaktionsgefäß unter Verwerfung der organischen Phase.
- Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol zur wäßrigen Phase.
- Präzipitation bei - 20 °C für 15 Min.
- Sammlung der gefällten RNA durch Zentrifugation bei 4 °C für 15 Min. (10.000 x g).
- Entfernung der überstehenden Flüssigkeit.
- Zweimaliges Waschen des entstandenen RNA-Pellets mit 1000 µl eiskaltem 75 %igem Ethanol mit anschließender Zentrifugation für 5 Min. bei 4 °C (10.000 x g).
- Entfernung des Ethanols, anschließend 5 Min. Trocknung des Pellets in einer Vakuumzentrifuge.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die RNA-Pellets bei - 20 °C gelagert.

### 3.2.3.3. Quantitative Bestimmung der RNA

Zur Bestimmung der Konzentration der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe eines Photometers die Absorption (optical density, OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen ( $OD_{260 \text{ nm}}$ ). Die Resuspension des RNA-Pellets in 23 µl DEPC-Wasser fand zur Beschleunigung des Vorgangs bei 65 °C statt. Anschließend erfolgte die Messung der  $OD_{260 \text{ nm}}$  in einer 50 fachen Verdünnung der Probe. Eine  $OD_{260 \text{ nm}}$  von 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg/µl Gesamt-RNA.

Die Konzentration der unverdünnten Probe errechnet sich mit folgender Formel:

$$c = OD_{260} \times 40 \text{ µg/µl} \times 50$$

$c$  = Konzentration der unverdünnten Lösung in µg/µl,

$OD_{260}$  = optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 260 nm

Zur Überprüfung der Reinheit dient der Quotient aus der  $OD_{260\text{ nm}} / OD_{280\text{ nm}}$ , der zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Kleinere Werte weisen auf Kontaminationen der Probe mit Phenol oder Proteinen hin, welche die nachfolgenden Reaktionsschritte behindern könnten. Derartige Proben wurden verworfen.

#### **3.2.3.4. Überprüfung der Intaktheit der RNA**

Um zu gewährleisten, daß die in die RT eingesetzte RNA nicht während der zuvor ausgeführten Schritte degradiert wurde, erfolgte eine Überprüfung ihrer Intaktheit anhand der Darstellbarkeit bestimmter Anteile der Gesamt-RNA im Agarosegel. Das Gemisch an RNA besteht aus drei verschiedenen RNA-Typen: Ribosomale-RNA (rRNA), Transfer-RNA und Messenger-RNA (mRNA). Rückschlüsse auf die Intaktheit der Gesamt-RNA gibt die Darstellung der 28 S und 18 S rRNA, wobei die Schärfe der Banden sowie deren Intensität auf einem EthBr-gefärbten Agarosegel als Qualitätskriterien gelten. Da die Menge der isolierten RNA bei einigen Proben sehr gering war, fand diese Überprüfung nur stichprobenartig statt.

Es wurde zunächst ein 1 %iges Formaldehyd-Agarosegel gegossen und für 15 Min. im einfach konzentrierten Laufpuffer (1x TAE) equilibriert. Der Formaldehyd-Zusatz diente der Denaturierung vorhandener RNA-Sekundärstrukturen, die aufgrund divergierender Wanderungsgeschwindigkeiten die Elektrophorese behindern würden. Von der RNA-Lösung wurden 1 µg Gesamt-RNA mit je 4 µl RNA-Auftragspuffer versetzt und in eine Tasche des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für 25 Minuten. Nach 15 Min. Färbung in verdünnter Ethidiumbromid-(EthBr)-Lösung wurden die unter ultraviolettem Licht sichtbaren rRNA-Banden beurteilt.

#### **3.2.3.5. Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion**

Die RT-PCR gliedert sich in zwei Reaktionsschritte. Zunächst wird aus dem Gemisch der Gesamt-RNA die mRNA unter Verwendung eines Enzyms, der Reversen Transkriptase, und eines für mRNA selektiven Startmoleküls (Primer) in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. Im anschließenden zweiten Reaktionsschritt, der eigentlichen PCR, werden als Primer ausgewählte



Oligonukleotidpaare eingesetzt, die eine selektive Amplifikation spezifischer Fragmente aus dem Pool an cDNA-Matrizen ermöglichen.

### 3.2.3.5.1. Eliminierung genomischer DNA-Kontaminationen

Bei der Isolierung von RNA aus Gewebe können trotz sorgfältigem Vorgehen Spuren genomischer DNA als Verunreinigungen auftreten. In der PCR würden diese Fragmente zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, da die Oligonukleotide nicht nur an die RNA-Transkripte binden, sondern sich auch an die genomische DNA anlagern. Eine Amplifikation beider Matrizen wäre die Folge. Bei Primerpaaren, die ein oder mehrere Introns umspannen, könnte diese Kontamination leicht aufgedeckt werden, da die PCR-Produkte genomischer DNA um die Zahl der Basenpaare des Introns länger erschienen als solche, die der RNA-Sequenz (*Template*) entstammten. Da die verwendeten Primerpaare der vorliegenden Arbeit jedoch keine Introns umspannten, mußte eine DNA-Kontamination auf andere Weise ausgeschlossen werden. Zur Eliminierung vorhandener genomischer DNA aus RNA-Isolaten wird eine Digestion mit DNase I in der Literatur empfohlen (DILLWORTH und McCARREY, 1992; HUANG et al., 1996). Hierzu wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

RNA in H <sub>2</sub> O	(2 µg RNA)	13,6 µl
Rnasin	(40 U/µl)	0,5 µl
DNase I	(10 U/µl)	1,0 µl

Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die DNase I 5 Min. bei 75 °C inaktiviert.

Pro Reaktion gelangte eine Menge von bis zu 2 µg Gesamt-RNA zum Einsatz. RNasin diente als Inhibitor ubiquitär vorhandener, degradierender RNasen.

### 3.2.3.5.2. Reverse Transkription

Für die selektive Umschreibung der mRNA aus dem Gemisch der verschiedenen RNA-Arten fand ein spezieller Primer Verwendung, dessen Anfangssequenz dem polyadenylierten 3'-Ende eukaryotischer mRNA komplementär gebaut war (oligo-(dt)-Primer). Mit dieser Methode wurde eine unspezifische Bindung des Primers an alle vorhandenen mRNA-Moleküle erreicht. Die verwendete Reverse Transkriptase entstammte dem *Molony Murine Leukaemia Virus* (M-MLV).

Zu Beginn der RT-Reaktion stand ein Inkubationsschritt des gesamten Volumens der Digestion (15,1 µl) mit 2,0 µl oligo-(dt)-Primer für 5 Min. bei 70 °C.

Anschließend ergab dieser Ansatz mit folgenden hinzugefügten Komponenten ein finales Reaktionsvolumen von 25 µl:

Präinkubiertes Gemisch	17,10 µl
Puffer (5x)	5,00 µl
Rnasin (40 U/µl)	0,65 µl
dNTP (10 mM)	1,25 µl
M-MLV-RT (200 U/µl)	1,00 µl

Nach einer Inkubation von 60 Min. bei 42 °C wurde das Reaktionsgemisch zur Denaturierung des Enzyms für 5 Min. auf 93 °C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Die entstandenen cDNA-Transkripte wurden auf eine Konzentration von 4 ng/µl mit H<sub>2</sub>O verdünnt und in Aliquots zu 20 µl bis zur Verwendung in der PCR bei - 20 °C gelagert.

### 3.2.3.5.3. Amplifikation der cDNA durch PCR

Für die Amplifikation der in der RT erhaltenen mRNA-Kopien wurden je 40 ng cDNA verwendet. Die Konzentration der cDNA wurde hierbei aus der in die RT eingesetzten Menge an Gesamt-RNA berechnet.

Zu einem finalen Reaktionsvolumen von 25 µl wurden folgende Komponenten pipettiert:

Puffer mit (NH) <sub>4</sub> SO	(10x)	2,50 µl
MgCl <sub>2</sub>	(25 mM)	2,00 µl
DNTP	(2 mM)	1,50 µl
Primer I	(10 µM)	1,00 µl
Primer II	(10 µM)	1,00 µl
Taq Polymerase	(5 U/µl)	0,15 µl
Template	(4 ng/µl)	10,00 µl
H <sub>2</sub> O		ad 25 µl

Eine Negativkontrolle (Ersatz des cDNA-Templates durch H<sub>2</sub>O) diene in jeder PCR zur Detektion eventuell vorliegender Kontaminationen der verwendeten Lösungen mit Fremd-DNA. Als Positivkontrolle wurde cDNA von ovinem Lebergewebe verwandt.

#### 3.2.3.5.4. Verwendete Primer

Bei der Erstellung der Primer wurde auf cDNA-Sequenzen aus der Online-Datenbank GenBank<sup>22</sup> zurückgegriffen. Die Sequenzen der Primer für das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), für den Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER) sowie für den *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1* (TIMP 1) waren schafspezifisch. Für die Erstellung der Oligonukleotide für (Pro-)Kollagen I (COL1A2) und die Matrixmetalloproteinase 1 (MMP 1) erfolgte ein Homologievergleich mehrerer verschiedener Spezies mit dem Programm BlastN<sup>21</sup>, da die ovine Sequenzen nicht bekannt waren. Die Primerpaare umschlossen einen ausgewählten, hochkonservierten Bereich, um die Wahrscheinlichkeit einer Anlagerung der Oligonukleotide an die unbekannten, speziesfremden Sequenzen zu erhöhen. Das Primerdesign erfolgte unter Beachtung allgemein gültiger Grundsätze hinsichtlich Länge, Gehalt der einzelnen Basen und Wechselwirkungen zwischen beiden Primern (RYCHLIK, 1995). Um Homologien zu anderen, unerwünschten Genen auszuschließen, fand ein Vergleich der Basenfolge der Primer mit allen bekannten

<sup>22</sup> [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Sequenzen über das Programm BlastN<sup>23</sup> statt. Die zu erwartenden Fragmentlängen betrugen 528 bis 790 Basenpaare (bp). Die Sequenzen der einzelnen Primerpaare sind in Tabelle 3.2.4 dargestellt.

---

<sup>23</sup> [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

Tabelle 3.2.4: Bezeichnung und Basenabfolge der Oligonukleotid-Paare, die in der RT-PCR mit cDNA-Matrizen aus ovinem Schafgewebe Verwendung fanden. Unter der Accession N<sup>o</sup> ist die Referenz-Sequenz in der GeneBank<sup>21</sup> Datenbank angegeben.

Parameter	Primername	Upstreamprimer (5' → 3')	Fragment-länge	GenBank Accession N <sup>o</sup>
		Downstreamprimer (5' → 3')		
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	GAPDH	tgg tca cca ggg ctg ct	791 bp	AF035421
		act ggt cct cag tgt acg		AF030943
Östrogenrezeptor $\alpha$	ER	ata atc gac gtc aag gtg gca	545 bp	Z49257
		agg tct ggt agg gtc ata ctc		
$\alpha_2$ -Kette des (Pro-) Kollagen I	COL1 A2	ggt gcc cct ggt gaa aat gg	632 bp	AF035120
		atc agc tcc agg aag acc acg		
Matrixmetalloproteinase 1	MMP 1	gtg atg aag cag ccc aga tg	632 bp	AF148882
		gaa cat cac ttc tcc ccg aa		
<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1</i>	TIMP 1	cgg tct ctg gca tcc tgt tg	530 bp	S67450
		ctg gaa ccc ctt gtc aga gc		

### 3.2.3.5.5. Reaktionsbedingungen der PCR

Die PCR wurde in einem Mastercycler Gradient durchgeführt. Die Berechnung der Anlagerungs-Temperaturen nach der modifizierten Methode von McGRAW (1990) ergab für die einzelnen Primer Temperaturen zwischen 60,4 °C und 66,5 °C. In Vorversuchen wurden die optimalen Temperaturen für die Anlagerung jedes Primerpaares an die DNA-Matrize (*Annealing*) festgelegt. Für GAPDH und ER konnte 61 °C als Optimum ermittelt werden, die übrigen Primer zeigten bei 62 °C ein gutes Annealing. Das Temperaturprogramm gestaltete sich wie folgt, wobei der Zyklus bestehend aus Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation 30 mal ausgeführt wurde:

Temperatur	Zeit	Aufgabe
93 °C	4 Min.	Initiale Denaturierung
93 °C	1 Min.	Denaturierung
n °C *	2 Min.	Primer-Annealing
72 °C	2 Min.	Elongation
72 °C	10 Min.	Schlußelongation
4 °C	bis zur Entnahme	

\* GAPDH, ER: 61 °C, alle anderen Primer: 62 °C

### 3.2.3.6. Darstellung der RT-PCR Produkte mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese

Für die Elektrophorese wurde ein 1,6 %iges Agarosegel hergestellt. Das Gel wurde für 15 Min. in der Elektrophoresekammer equilibriert. In dieser Zeit wurde jede Probe mit je 5 µl Auftragspuffer versetzt. Aus diesem Gemisch wurde ein identisches Volumen von 15 µl in je eine Tasche des Agarosegels pipettiert. Als Längenstandard für die Überprüfung der entstandenen PCR-Produkte wurden je 2 µl des Markers Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus in einer separaten Tasche des Gels mitgeführt.

Die Elektrophorese geschah unter folgenden Bedingungen:

Laufpuffer:	1x TAE-Gebrauchspuffer
Spannung:	100 Volt
Dauer	30 Min.

Anschließend erfolgte eine 20 minütige Färbung des Gels in frisch angesetzter EthBr-Färbelösung. Die Amplifikatbanden wurden unter ultraviolettem Licht betrachtet und deren Größe mit dem Längenstandard verglichen. Die digitale Dokumentation der Gele erfolgte mit Hilfe des computergestützten Kamerasystems Phoretix Grabber.

### **3.2.3.7. Optimierung der PCR-Protokolle für die semiquantitative Auswertung**

Unter experimentellen Bedingungen vermehren sich nur in der Anfangsphase der PCR die Produkte exponentiell zur initialen Menge der Matrizen. Ab einer bestimmten Anzahl von Zyklen flacht sich diese Kurve deutlich ab und erreicht schließlich ein Plateau. Für quantitative Auswertungen von PCR-Produkten ist es notwendig, die Anzahl an Zyklen herauszufinden, in denen die exponentielle Amplifikationsphase erfolgt, da bei Erreichen des Plateaus keine Aussagen über unterschiedliche Expressionsraten gegeben werden können.

Um die erforderliche Zyklenanzahl für die einzelnen Oligonukleotide zu ermitteln, wurden PCR-Durchgänge mit einer ansteigenden Anzahl an Zyklen durchgeführt (24, 27, 30, 33 Zyklen). Als Template diente cDNA aus ovinem Vaginalgewebe aller drei Probandengruppen. Die digital aufgenommenen Gele wurden mit Hilfe des Computerprogramms Total Lab Phoretix 1D ausgewertet (MARONE et al., 2001). Hierbei erfolgte eine Bestimmung der optischen Dichte (OD) der gefärbten Produktbanden, wobei die Höhe der OD von der Menge an PCR-Produkten abhing. Die erhaltenen OD-Werte wurden gegen die Zyklenanzahl aufgetragen und als Kurve graphisch dargestellt. Die für die weiteren Experimente ausgewählte Zyklenanzahl befand sich innerhalb des exponentiellen Anstiegs der PCR (HORIKOSHI und SAKAKIBARA, 2000; MARONE et al., 2001). Dieser Optimierungsschritt durchlief für jedes Primerpaar eine zweimalige Verifizierung.

### 3.2.3.8. Semiquantitative Auswertung der Expressionsrate

Als Bezugspunkt für die semiquantitative Untersuchung der Expressionsraten diene das „*House Keeping Gen*“ GAPDH.

Die Quantifizierung der PCR-Amplifikate erfolgte nach der Methode von NASH (1998):

- Erstellung einer Standardkurve jedes spezifischen PCR-Produkt,
- Berechnung der Rohdaten der einzelnen Parameter anhand der Standardkurve,
- Normalisierung der Rohdaten über die GAPDH-Expressionsrate.

#### 3.2.3.8.1. Erstellung einer Standardkurve

Wegen der logarithmischen Beziehung zwischen Amplifikatmenge und optischer Dichte der EthBr-gefärbten Banden auf dem Agarosegel, ist die Erstellung einer Standardkurve notwendig. Diese wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des produktspezifischen cDNA-Templates für jedes Fragment erzeugt.

Für die Präparation des Templates wurden Amplifikate aus einer nicht-quantitativen PCR verwendet, wobei die entsprechende Bande aus einem EthBr-gefärbten 1,6 %igen Agarosegel ausgeschnitten wurde. Die cDNA-Extraktion aus dem Agarosegel fand mit Hilfe des JetSorb-Kits gemäß Herstellerprotokoll statt. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 13.000 x g:

- Lösung des ausgeschnittenen Agarosegels in 300µl Puffer A1 und 10µl JetSorb Suspension und Bindung der DNA durch eine 15 minütige Inkubation bei 50 °C.
- Zentrifugation der Suspension für 30 sek., Verwerfen des Überstandes.
- Einmalige Waschung des erhaltenen Pellets mit 300 µl Puffer A1 (hoher Salzgehalt).
- Zentrifugation der Suspension für 30 Sek., Verwerfen des Überstandes.
- Zweimaliges Waschen des Pellets mit je 300 µl Puffer A2 (niedriger Salzgehalt).



- Zentrifugation der Suspension für 30 Sek., Verwerfen des Überstandes.
- Trocknen des Pellets bei geöffnetem Probengefäß für 10 Min. bei 50 °C.
- 2 malige Resuspension der DNA in 20 µl Wasser.

Die erhaltene cDNA-Suspension wurde in einer Verdünnungsreihe jeweils 10-fach verdünnt (1x, 10x, 100x, 1000x, 10000x). Diese Lösungen wurden wie beschrieben in der PCR amplifiziert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Die digitalisierten Daten der OD wurden gegen die Verdünnungsstufen graphisch mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism 4.0 in Form einer Regressionsgeraden dargestellt. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde jedes Experiment zweimal durchgeführt. Aufgrund der geringen Variation der Expression wurde bei MMP 1 auf die Erstellung einer Standardkurve verzichtet, da keine Beeinflussung bezüglich der statistischen Auswertung erwartet wurde. Zur weiteren Berechnung des Expressionsniveaus wurden die erhaltenen Ergebnisse der OD-Messung in die Formel für die Normalisierung eingesetzt.

#### **3.2.3.8.2. Berechnung der Rohdaten**

Jede Probe wurde einer PCR mit den entsprechenden Primerpaaren und einer anschließenden Gelelektrophorese unterzogen. Für den Vergleich der Expressionsraten war für jeden untersuchten Parameter ein simultaner PCR-Durchlauf aller Proben notwendig, um systemale Fehler durch abweichende Reaktionsbedingungen so gering wie möglich zu halten. Zudem erfolgte zur Absicherung der Ergebnisse eine zweimalige Durchführung aller Experimente. Die digitale Auswertung der EthBr-gefärbten, 1,6 %igen Agarosegele erfolgte wiederum mit Hilfe des Computerprogramms Total Lab Phoretix 1D (MARONE et al., 2001).

Die erhaltenen Daten - im Folgenden als Rohdaten bezeichnet - wurden mit den Funktionen der Standardkurven berechnet:

$$y = m * \log(x) + b$$

$y$  = OD-Meßwert,  $m$  = Steigung,  
 $x$  = Amplifikatmenge,  $b$  = y-Achsenabschnitt

### 3.2.3.8.3. Normalisierung der Rohdaten

Um die Werte der spezifischen Amplifikate zu bereinigen, wurden die für die GAPDH ermittelten Rohdaten auf eine zufällig ausgewählte Probe mit nachstehender Formel normalisiert:

$$y_i = x / x_i$$

$x$  = Rohdaten der zufällig ausgewählten Probe,  
 $x_i$  = Rohdaten der übrigen Proben

Dieser Faktor blieb für jeden Parameter in allen folgenden Rechenschritten gleich. Anschließend erfolgte eine Multiplikation der Rohdaten jedes Amplifikats mit dem entsprechenden Faktor. Unterschiede in der Höhe der Amplifikatmenge resultieren aus einer differentiellen mRNA-Expression innerhalb des Gewebes.

### 3.2.3.9. Sequenzierung des cDNA-Fragments der $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I und des Östrogenrezeptor $\alpha$

Zur Überprüfung der Sequenz der cDNA-Amplifikate der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I und des Östrogenrezeptor  $\alpha$  wurde eine PCR mit ovinem Vaginalgewebe über 30 Zyklen nach den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Aufreinigung und Schätzung der erhaltenen Konzentration der DNA-haltigen Lösung geschah in folgenden Schritten:

- Elektrophoretische Auftrennung der Produkte und Ausschneiden der Banden aus dem EthBr-gefärbten Agarosegel unter UV-Licht.
- Aufreinigung der DNA mittels JetSorb-Kit wie unter Kapitel 3.2.3.8.1. beschrieben.
- Schätzen der Konzentration anhand eines Vergleichs der optischen Dichte von 2 µl DNA-haltiger Lösung und dem genormten Gehalt eines 500 bp großen Fragments des Größenstandards Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus auf einem EthBr-gefärbten Agarosegel.
- Überführen eines entsprechenden Volumens von 20 ng DNA pro 100 bp Fragmentlänge in ein neues Reaktionsgefäß und Lyophilisieren der Probe bei 37 °C über Nacht.

Die lyophilisierte DNA wurde zusammen mit dem entsprechenden Primer zur Sequenzierung an das Labor MWG-Biotech, Eberberg versandt. Die Sequenzierung wurde dort nach der Methode der Real Time Elektrophorese durchgeführt.

Zur Überprüfung der Homologie mit bekannten Sequenzen des Schafes und anderer Säugetierspezies wurden die erhaltenen Basenabfolgen mit dem Programm BlastN<sup>23</sup> mit den verfügbaren Datenbanken verglichen.

### **3.2.4. Histologische Techniken**

#### **3.2.4.1. Probenaufbereitung**

Die Proben wurden zur Reinigung von Blutresten in Natriumphosphatpuffer gespült. Es schloß sich eine Fixierung in 4 %igen neutral gepufferten Formol nach LILLIE (1976) über 48 Stunden bei + 4 °C an. Bis zur automatisierten Einbettung in Paraffin durch das Institut für Veterinäranatomie, -histologie und -embryologie lagerten die fixierten Proben bei + 4 °C in Natriumphosphatpuffer. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 4 - 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf APES-beschichtete Objektträger überführt. Pro Biopat erfolgte eine Anfertigung von vier Schnitten.

### 3.2.4.2. Färbemethoden

Alle Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Diese Färbung geschah bei Raumtemperatur in folgenden Arbeitsschritten:

Arbeitsschritt	Dauer
Xylol	15 Min.
Xylol	15 Min.
Ethanol absolut	5 Min.
Ethanol 96 %	5 Min.
Ethanol 80 %	5 Min.
Ethanol 70 %	5 Min.
Ethanol 60 %	5 Min.
Ethanol 50 %	5 Min.
Aqua dest.	5 Min.
Hämatoxylin	5 Min.
Leitungswasser	15 Min. wässern
Eosin <sup>24</sup>	4 Min.
Aqua dest.	3 x tauchen
Ethanol 70 %	1 x tauchen
Ethanol 96 %	2 Min.
Ethanol absolut	30 Sek.
Xylol	10 Min.
Xylol	10 Min.
Eindeckeln der Schnitte mit Euparal	

<sup>24</sup> unter Zugabe von 1 µl Eisessig

### 3.2.4.3. Histologische Auswertung

Für die Durchführung der histologischen Untersuchungen stand ein mit einem Kamerasystem ausgestattetes Leica DMR Mikroskop zur Verfügung. Die Bilder wurden digital auf einen PC übertragen und dort mit Hilfe des Bildanalyseprogrammes Leica Image Manager ausgewertet.

Es fanden nur Schnitte Verwendung, welche den typischen histologischen Aufbau der Vagina aufwiesen. Ausschlusskriterien stellten Entnahme- und Fixationsartefakte dar. Pro Schaf gelangte je ein Gewebeschnitt zur Auswertung. Zur genauen Beschreibung der Lokalisation wurde das vaginale Gewebe abweichend vom klassischen histologischen Aufbau in vier Zonen unterteilt. Dabei erhielt die Untergliederung der *Lamina propria mucosae* in zwei Zonen in Anlehnung an LUQUE (1997) den Vorzug:

Zone I: Oberflächliches Schleimhautepithel

Zone II: Subepitheliale Schicht (Bereich bis zu 80 µm unterhalb des Schleimhautepithels)

Zone III: Bereich zwischen Zone II und der *Tunica muscularis*

Zone IV: *Tunica muscularis*

Bewertungskriterien bei 400 - 1000 facher Vergrößerung waren folgende morphometrischen Parameter in der *Tunica mucosa*:

- Epithelhöhe (400 x)
- Anzahl der Epithelzellschichten (1000 x)

Die Messung der Höhe des Epithels wurde pro Gewebeschnitt in 4 Gesichtsfeldern an je 5 Punkten durchgeführt. Die Auszählung der Anzahl an Zellschichten innerhalb des *Epithelium mucosae* fand in 4 Gesichtsfeldern je Präparat statt.

Weiterhin wurde die Morphologie der Epithelzellen sowie die Infiltration der verschiedenen Schichten mit Entzündungszellen bei einer 1000 fachen Vergrößerung innerhalb jedes Gewebeschnitts erfaßt.

### 3.2.5. Statistische Verfahren

Die Datenauswertung erfolgte auf den Rechnern des lokalen Rechnernetzwerkes der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus Liebig Universität Gießen. Für die statistischen Auswertung fand das Statistikprogrammpaket BMDP/Dynamic, Release 7.0 Verwendung (DIXON, 1993). Die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde auf einem Personalcomputer mit den Programmen Graph Pad Prism 4.0 und Microsoft Excel 2000 durchgeführt.

Zur Datenbeschreibung wurden arithmetische Mittelwerte ( $\bar{x}_a$ ), Standardabweichung (SD), Minima (Min) und Maxima (Max), Spannweiten und Stichprobenumfänge (n) berechnet und in tabellarischer Form wiedergegeben. Bei rechtsschiefer Verteilung der Merkmale wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt. In diesen Fällen erfolgte die Beschreibung der Daten mittels geometrischer Mittelwerte ( $\bar{x}_g$ ) und Streufaktoren (SF).

Zur Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz fand bei der Mehrzahl der Merkmale die Methode der Einfaktoriellen Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D Anwendung. Der annähernd normalverteilte Parameter der Lämmeranzahl wurde mit Hilfe einer Häufigkeitstabelle und dem exakten Test von Fischer überprüft. Für die Untersuchung der Zusammenhänge der Trächtigkeitsdauer wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit dem Programm BMDP3D durchgeführt. Die Analyse der Ergebnisse der Expressionsstudien erfolgte mit dem t-Test für unabhängige Stichproben (Programm BMDP3D). Die Prüfung des Gruppeneinflusses des Parameters der Expression der MMP 1-mRNA wurde für die Gruppen 1 und 3 mit Hilfe des einseitigen exakten Test von Fischer durchgeführt.

## 4. ERGEBNISSE

Die Beschreibung der Ergebnisse ist in vier Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil werden die klinischen Befunde dargelegt, die sich insbesondere auf den Partus, die Lämmeranzahl und die perinatale Sterblichkeit in den verschiedenen Gruppen beziehen.

Der zweite Abschnitt beschreibt die hormonelle Lage sowie die Plasmakonzentrationen der Elektrolyte Kalzium, anorganisches Phosphat, Magnesium und Natrium.

Im dritten Teil wird die Expression der mRNA ausgewählter Parameter des kollagenen Bindegewebsmetabolismus sowie des Östrogenrezeptors  $\alpha$  vergleichend dargestellt.

Abschließend erfolgt die Beschreibung histomorphologischer Befunde von prolapiertem und nicht vorgefallenem Vaginalgewebe.

### 4.1. Klinische Ergebnisse

#### 4.1.1. Klinische Befunde zum Zeitpunkt der Probenentnahme

Bei keinem der Tiere der Gruppen 1 und 2 waren Auffälligkeiten in der klinischen Allgemeinuntersuchung festzustellen. Die klinisch-gynäkologische Untersuchung ergab keine Hinweise auf eine genitale oder extragenitale Erkrankung der Probanden.

In dem Kollektiv der Schafe mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. fiel ein Tier mit einem mittelgradig gestörtem Allgemeinbefinden und einer erhöhten Körperinnentemperatur von 40,9 °C auf. Ein anderes Schaf zeigte einen schwach positiven Harnketontest bei geringgradig gestörtem Allgemeinbefinden. Das Allgemeinbefinden der verbleibenden Probanden dieser Gruppe wurde als leicht gestört eingestuft.

Bei der sonographischen Überprüfung der Gravidität konnten keine pathologischen Veränderungen der Früchte und der Gebärmutter detektiert werden. Die fetale Herzfrequenz lag über 120 Schlägen pro Minute, Fruchtwasser und Eihäute wiesen keine Veränderungen auf. Eine genaue Bestimmung des Gestationsalters war aufgrund des üblichen Herdenmanagements des Belegens der Muttertiere durch einen freilaufenden Bock nicht möglich.

#### 4.1.2. Intervall zwischen Probenentnahme und Partus

Zur Beurteilung der Ergebnisse mußte die Trächtigkeitsdauer nach Entnahme der Blutproben und Vaginalbiopate berücksichtigt werden. Die Probengewinnung bei Tieren der Gruppe 2 geschah i.p. nach der Austreibung der letzten Frucht. Angegeben für die Gruppen 1 und 3 sind der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}_a$ ) und die Standardabweichung (SD).

In der Gruppe 1 ist der Geburtsbeginn in allen fünf Fällen spontan erfolgt. Die Zeitspanne zwischen Probenentnahme und Partus betrug 6 - 29 Tage, mit einem Mittel von  $16,0 \pm 9,1$  Tagen.

Bei einem der sechs Schafe mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. mußte wegen einer hochgradigen Verschlechterung des Allgemeinbefindens einen Tag nach der Probenentnahme eine präterminale *Sectio caesarea* durchgeführt werden. Die verbleibenden Tiere zeigten einen natürlichen Eintritt des Partus. Im Durchschnitt endete die Trächtigkeit  $11,7 \pm 10,3$  Tage nach der Biopotentnahme mit einem Maximum von 27 Tagen und einem Minimum von 0 Tagen (Tabelle 4.1.1 und Abbildung 4.1.1).



Tabelle 4.1.1: Intervall zwischen Probenentnahme und Geburt bei hochgraviden Tieren (Gruppe 1) und Schafen mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3). Die Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Gruppe	Proband	Intervall Probenentnahme und Partus in Tagen		
		Einzelwerte	$\bar{x}_a \pm SD$	Min/Max Spannweite
1 ungestörte Trächtigkeit	1	21	$16,0 \pm 9,1$	6/29 23
	2	6		
	3	10		
	4	14		
	5	29		
3 <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	0 (Präterminale Sectio)	$11,7 \pm 10,3$	0/27 27
	2	10		
	3	27		
	4	21		
	5	5		
	6	7		

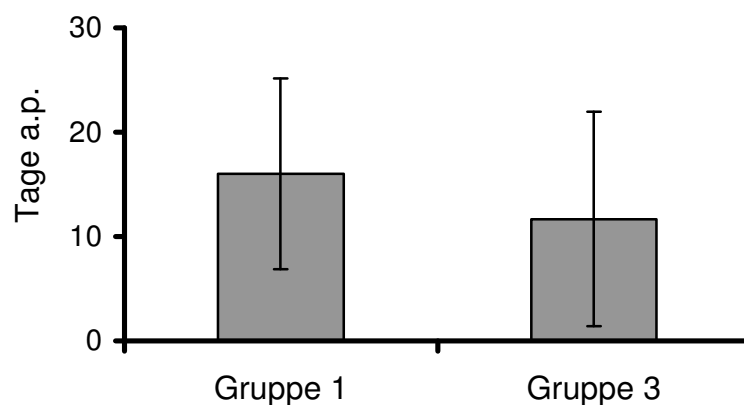


Abbildung 4.1.1 Intervall zwischen der Probenentnahme und der Geburt bei Schafen mit (Gruppe 3) und ohne antepartalem *Prolapsus vaginae* (Gruppe 1), dargestellt als  $\bar{x}_a \pm SD$ . Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

#### 4.1.3. Verlauf der Geburt, Lämmeranzahl und perinatale Sterblichkeit

Bei 12 der 15 Geburten traten keine Störungen auf. Wegen einer Dystokie mußte in zwei Fällen eine *Sectio caesarea* durchgeführt werden. Ein weiterer Kaiserschnitt wurde notwendig, da sich das Allgemeinbefinden eines Muttertieres dramatisch verschlechterte. Insgesamt wurden aus 6 Einlings- und 9 Zwillingsgraviditäten 24 Lämmer geboren. Ein Zwillingspaar wurde bereits tot entwickelt, ein weiteres verstarb innerhalb der ersten 24 Lebensstunden. Unter den adulten Schafen ereigneten sich keine Todesfälle.

In Gruppe 1 und 2 waren ausnahmslos komplikationsfreie Normalgeburten mit durchschnittlich  $1,6 \pm 0,5$  (Gruppe 1) beziehungsweise  $1,5 \pm 0,6$  (Gruppe 2) Lämmern zu verzeichnen, die kein tierärztliches Eingreifen erforderten. In der Gruppe 1 kamen 8 Lämmer zu Welt, wobei es sich um drei Zwillings- und zwei Einlingsgeburten handelte. Die 6 Neugeborenen der Gruppe 2 verteilten sich auf zwei Zwillings- und zwei Einlingsgeburten (Abbildung 4.1.2). Alle 14 Lämmer aus beiden Gruppen wurden anhand des Durchbruchs der *Incisivi* sowie der Körper- und Nabelbehaarung als matur eingestuft und zeigten bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 5 Tagen *post natum* eine ungestörte Entwicklung.

Bei Schafen mit einem antepartalen Vaginalprolaps verlief die Geburt nur zu 50 % ( $n = 3$ ) ohne Komplikationen. In zwei Fällen konnte durch die geburtshilfliche Untersuchung als Ursache der Dystokie eine mangelhafte Öffnung der Zervix (Zervixmanschette) diagnostiziert werden, die zur Beendigung der Geburt eine *Sectio caesarea* erforderte. Bei einer dieser Operationen wurden die beiden maturen Früchte tot entwickelt. Der zur Rettung des Lebens des Muttertieres durchgeführte präterminale Kaiserschnitt brachte prämatüre Zwillinge hervor, die innerhalb der ersten 24 Lebensstunden verstarben.

Es kamen 9 Lämmer zu Welt, die sich auf 3 Einlings- und 3 Zwillingsgeburten verteilten (Abbildung 4.1.2). Im Durchschnitt betrug dies  $1,5 \pm 0,5$  Lämmer pro Geburt, die perinatale Sterblichkeit innerhalb der ersten 5 Lebenstage betrug 44 % ( $n = 4$ ).

Die Überprüfung der Ergebnisse erbrachte statistisch keine signifikanten Unterschiede der Lämmeranzahl pro Geburt zwischen den einzelnen Gruppen.

Tabelle 4.1.2 Anzahl geborener Lämmer pro Geburt bei Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2), und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3). Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Gruppe	Proband	Lämmer pro Geburt	
		Einzelwerte	$\bar{x}_a \pm SD$
1 ungestörte Trächtigkeit	1	2	1,6 $\pm$ 0,5
	2	2	
	3	1	
	4	1	
	5	2	
2 <i>intra partum</i>	1	2	1,5 $\pm$ 0,6
	2	2	
	3	1	
	4	1	
3 <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	2	1,5 $\pm$ 0,5
	2	2	
	3	1	
	4	1	
	5	2	
	6	1	

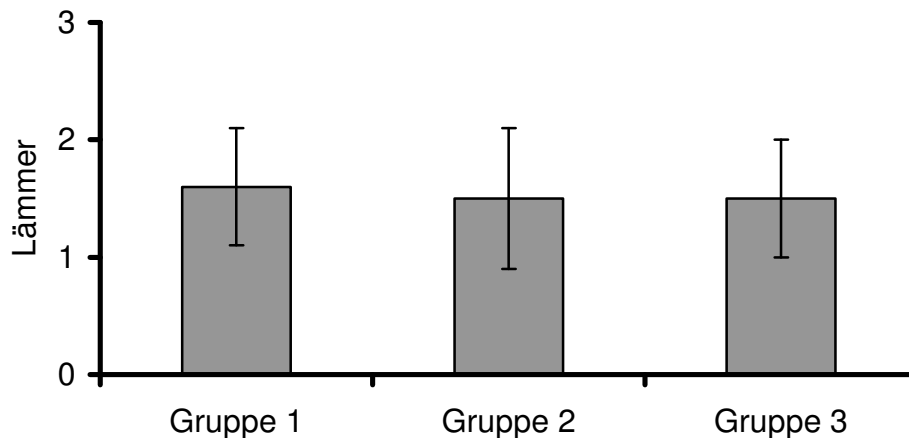


Abbildung 4.1.2 Lämmeranzahl pro Geburt bei Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2), und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3), dargestellt als  $\bar{x}_a \pm SD$ . Die Ergebnisse erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

## 4.2. Blutuntersuchungen

Die Untersuchung der Blutproben konnte bei 14 der 15 Probanden durchgeführt werden. Bei einem Schaf aus Gruppe 1 mußten Serum und Plasma aufgrund einer Hämolyse verworfen werden, da hierdurch Verfälschungen der Meßwerte bei den zu bestimmenden Parametern zu erwarten waren.

### 4.2.1. Plasmaelektrolytkonzentrationen

Die Mittelwerte sind bei den Elektrolyten Kalzium, anorganisches Phosphat, Magnesium und Natrium als arithmetisches Mittel ( $\bar{x}_a$ ) und Standardabweichung (SD) angegeben.

#### 4.2.1.1. Gesamt-Kalzium

Der durchschnittliche Gehalt an Gesamt-Kalzium im Blutplasma von gesunden, hochgraviden Schafen beträgt  $2,25 \pm 0,19$  mmol/l. Die mittleren Kalziumwerte der Gruppe 2 liegen mit  $2,20 \pm 0,13$  mmol/l unter denen der Gruppe 1. Den niedrigsten, durchschnittlichen Blut-Kalziumgehalt ( $2,04 \pm 0,15$  mmol/l) weisen Tiere mit einem antepartalen Vaginalprolaps auf. Die Gruppenunterschiede stellen sich als statistisch nicht signifikant dar (Tabelle 4.2.1 und Abbildung 4.2.1).

Tabelle 4.2.1 Gesamt-Kalziumkonzentration im Plasma von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3). Die Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Gruppe	Proband	Gesamt-Kalziumkonzentration (mmol/l)		
		Einzelwerte	$\bar{x}_a \pm SD$	Min/Max Spannweite
1  ungestörte Trächtigkeit	1	2,18	$2,25 \pm 0,19$	2,15 / 2,53 0,40
	2	2,53		
	3	2,15		
	4	2,15		
2  <i>intra partum</i>	1	2,10	$2,20 \pm 0,13$	2,07 / 2,33 0,26
	2	2,07		
	3	2,28		
	4	2,33		
3  <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	2,08	$2,04 \pm 0,15$	1,84 / 2,15 0,31
	2	1,84		
	3	2,15		
	4	1,85		
	5	2,15		
	6	2,16		

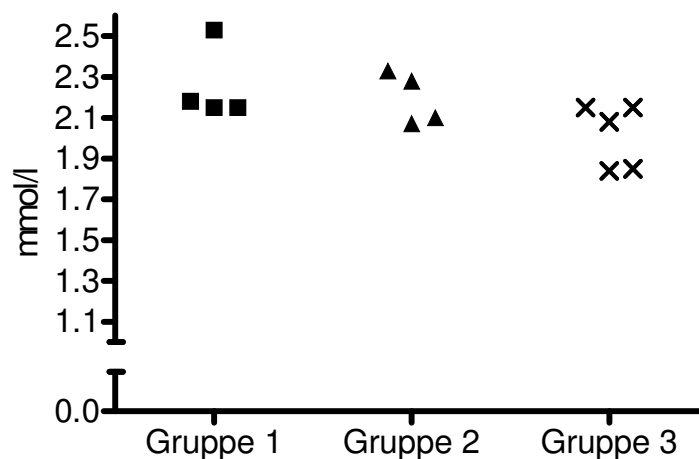


Abbildung 4.2.1 Darstellung der Einzelergebnisse der Konzentration des Gesamt-Kalziums im Blutplasma von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3). Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

#### 4.2.1.2. Anorganisches Phosphat

Bezüglich des anorganischen Phosphats können ähnliche Tendenzen wie beim Gesamt-Kalzium beobachtet werden. Den höchsten mittleren Gehalt weist mit  $1,82 \pm 0,09$  mmol/l die Gruppe 1 auf. Innerhalb des Kollektivs der Schafe i.p. kann ein durchschnittlicher Phosphatspiegel von  $1,47 \pm 0,45$  mmol/l ermittelt werden. Am geringsten ist der Mittelwert bei Gruppe 3 ( $1,30 \pm 0,27$  mmol/l). Die Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant (Tabelle 4.2.2 und Abbildung 4.2.2).

Tabelle 4.2.2      Konzentration des anorganischen Phosphats im Plasma von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3). Die Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Gruppe	Proband	Konzentration des anorganischen Phosphats (mmol/l)		
		Einzelwerte	$\bar{x}_a \pm SD$	Min/Max Spannweite
1  ungestörte Trächtigkeit	1	1,87	1,82 $\pm$ 0,09	1,69/1,88 0,19
	2	1,88		
	3	1,85		
	4	1,69		
2  <i>intra partum</i>	1	1,07	1,47 $\pm$ 0,45	1,07 / 1,93 0,86
	2	1,08		
	3	1,78		
	4	1,93		
3  <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	1,8	1,30 $\pm$ 0,27	1,0 / 1,8 0,8
	2	1,0		
	3	1,2		
	4	1,3		
	5	1,2		
	6	1,3		

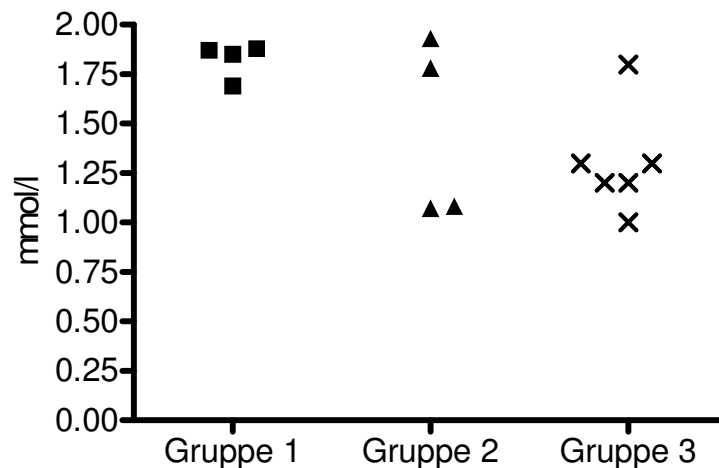


Abbildung 4.2.2 Darstellung der Einzelergebnisse der Konzentration des anorganischen Phosphats im Blutplasma von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3). Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

#### 4.2.1.3. Magnesium

Die Magnesiumkonzentrationen im Plasma zeigten nur geringe Unterschiede zwischen den drei Untersuchungsgruppen (Tabelle 4.2.3, Abbildung 4.2.3). Zwar konnte in Gruppe 1 mit  $0,80 \pm 0,11$  mmol/l der niedrigste arithmetische Mittelwert errechnet werden, doch sind die Differenzen zu Gruppe 2 ( $0,90 \pm 0,07$  mmol/l) und Gruppe 3 ( $0,96 \pm 0,17$  mmol/l) statistisch nicht signifikant ( $p = 0,21$ ).



Tabelle 4.2.3 Magnesiumkonzentration im Plasma von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3). Die Unterschiede erschienen statistisch nicht signifikant.

Gruppe	Proband	Magnesiumkonzentration (mmol/l)		
		Einzelwerte	$\bar{x}_a \pm SD$	Min/Max Spannweite
1  ungestörte Trächtigkeit	1	0,89	0,80 $\pm$ 0,11	0,69 / 0,89 0,20
	2	0,89		
	3	0,72		
	4	0,69		
2  <i>intra partum</i>	1	0,90	0,90 $\pm$ 0,07	0,79 / 0,96 0,20
	2	0,79		
	3	0,93		
	4	0,96		
3  <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	1,12	0,96 $\pm$ 0,17	0,75 / 1,15 0,40
	2	1,15		
	3	0,85		
	4	0,83		
	5	0,75		
	6	1,07		

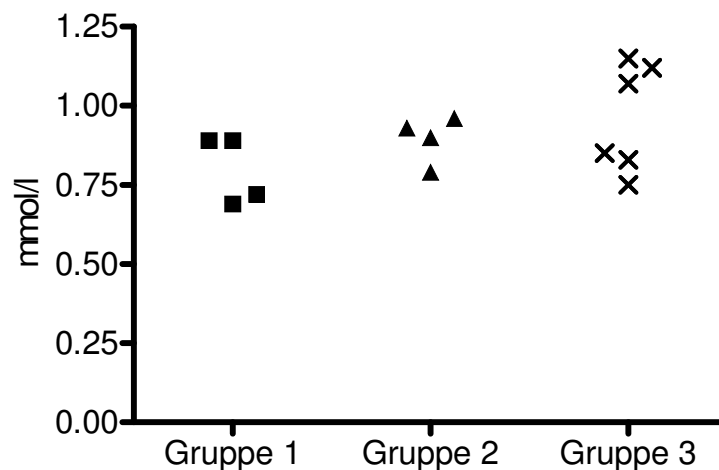


Abbildung 4.2.3 Darstellung der Einzelergebnisse der Konzentration des Magnesium im Blutplasma von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3). Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

#### 4.2.1.4. Natrium

Die Plasmakonzentrationen von Natrium unterscheiden sich ebenfalls nicht hinsichtlich ihrer arithmetischen Gruppenmittelwerte (Gruppe 1:  $142,65 \pm 3,85$  mmol/l; Gruppe 2:  $147,95 \pm 1,67$  mmol/l; Gruppe 3:  $145,33 \pm 3,08$  mmol/l). Bei Schafen mit ungestörter Hochgravidität konnten im Durchschnitt zwar die niedrigsten Natriumkonzentration bestimmt werden, doch ist der Gruppenunterschied nicht statistisch signifikant ( $p = 0,09$ ; Tabelle 4.2.4, Abbildung 4.2.4).

Tabelle 4.2.4 Natriumkonzentration im Plasma von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3). Die Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Gruppe	Proband	Natriumkonzentration (mmol/l)		
		Einzelwerte	$\bar{x}_a \pm SD$	Min/Max Spannweite
1  ungestörte Trächtigkeit	1	147,6	142,65 $\pm 3,85$	139 / 147,6 8,6
	2	143,7		
	3	139		
	4	140,3		
	5	nicht untersucht		
2  <i>intra partum</i>	1	149	147,95 $\pm 1,67$	146,2 / 149,7 3,5
	2	149,7		
	3	146,2		
	4	146,9		
3  <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	148	145,33 $\pm 3,08$	141 / 148 7,0
	2	141		
	3	148		
	4	148		
	5	143		
	6	144		

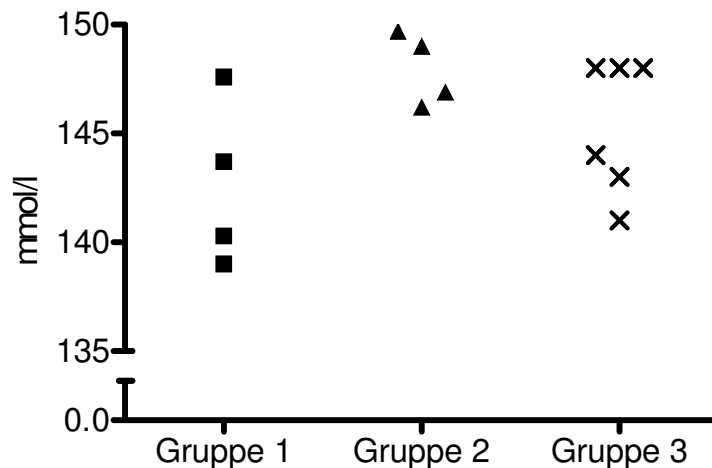


Abbildung 4.2.4 Darstellung der Einzelergebnisse der Konzentration des Natrium im Blutplasma von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3). Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

#### 4.2.2. Hormonkonzentrationen

Insgesamt fällt eine hohe Streuung der Einzelwerte für die Konzentrationen der Steroidhormone Östradiol-17 $\beta$  und Progesteron auf. Da keine Normalverteilung vorlag, erfolgte für den Gruppenvergleich eine Berechnung des geometrischen Mittelwertes ( $\bar{x}_g$ ) und des Streufaktors (SF).

##### 4.2.2.1. Progesteron

Die Progesteronkonzentrationen zeigen nur geringe Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Die Tiere mit *Prolapsus vaginae* a.p. (61,518 nmol/l, SF 1,327) wiesen die höchsten Werten im Vergleich zu den Schafen i.p. (29,393 nmol/l, SF 1,923) und Schafen mit ungestörter Trächtigkeit auf (33,189 nmol/l, SF 1,581). Die Differenzen sind jedoch nicht statistisch signifikant (Tabelle 4.2.5 und Abbildung 4.2.5).

Tabelle 4.2.5 Progesteronkonzentration im Plasma von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3). Die Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Gruppe	Proband	Progesteronkonzentration (nmol/l)		
		Einzelwerte	$\bar{x}_g$ / SF	Min/Max Spannweite
1  ungestörte Trächtigkeit	1	44,665	33,189 / 1,581	18,184/50,101 31,917
	2	50,101		
	3	29,819		
	4	18,184		
2  <i>intra partum</i>	1	53,375	29,393 / 1,923	15,577/50,069 34,492
	2	50,069		
	3	15,577		
	4	17,930		
3  <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	71,178	61,518 / 1,327	36,336/78,871 42,535
	2	70,558		
	3	67,713		
	4	55,617		
	5	78,871		
	6	36,336		

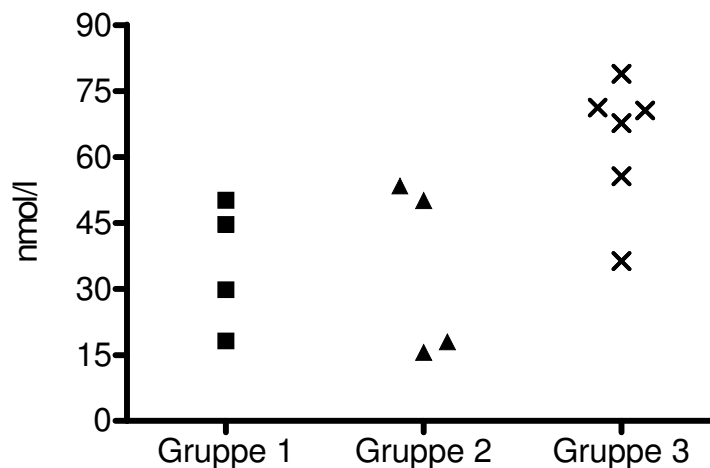


Abbildung 4.2.5 Darstellung der Progesteronkonzentration im Plasma von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3) in Form der Einzelwerte. Die Unterschiede stellen sich als statistisch nicht signifikant dar.

#### 4.2.2.2. Östradiol-17 $\beta$

Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bei den Plasmakonzentrationen des Östradiol-17 $\beta$  zwischen den Gruppen nachgewiesen werden ( $p = 0,21$ ). Die Schafe i.p. wiesen die höchsten Hormonwerte auf (395,6 pmol/l, SF 11,72), während bei den graviden Tieren ohne (73,9 pmol/l, SF 1,49) und mit *Prolapsus vaginae* (102,1 pmol/l, SF 1,56) Konzentrationen in einer ähnlichen Größenordnung zu messen waren (Tabelle 4.2.6 und Abbildung 4.2.6).

Tabelle 4.2.6      Konzentration an Östradiol-17 $\beta$  im Plasma von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3). Die Ergebnisse sind statistisch nicht signifikant.

Gruppe	Proband	Östradiol-17 $\beta$ -Konzentration (pmol/l)		
		Einzelwerte	$\bar{x}_g$ / SF	Min/Max Spannweite
1  ungestörte Trächtigkeit	1	41,10	73,9 / 1,49	41,10/96,89 55,79
	2	85,14		
	3	88,08		
	4	96,89		
2  <i>intra partum</i>	1	46,98	395,6 / 11,72	46,89/3670 3623,11
	2	46,98		
	3	3024,08		
	4	3670,00		
3  <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	107,90	102,1 / 1,56	46,98/173,22 126,24
	2	111,20		
	3	133,59		
	4	86,61		
	5	173,22		
	6	46,98		

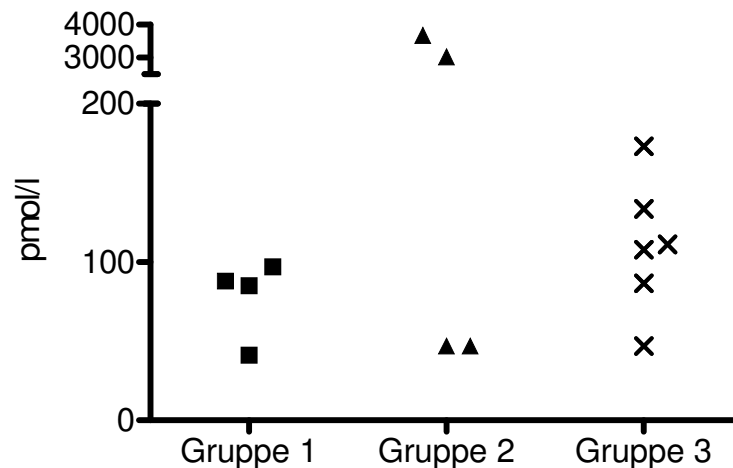


Abbildung 4.2.6 Darstellung der Konzentration an Östradiol-17 $\beta$  im Plasma von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3) in Form der Einzelwerte. Die Unterschiede stellen sich als statistisch nicht signifikant dar.

### 4.3. Molekularbiologische Ergebnisse

#### 4.3.1. Vorversuche

##### 4.3.1.1. RNA-Isolation

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus den tiefgefrorenen Biopтатаen der Vaginalwand von Schafen wurden zunächst zwei Methoden hinsichtlich ihrer Effizienz verglichen. Die erste Methode basierte auf einer Extraktion der RNA durch Fällungsreaktionen mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (Methode 1). Die genauen Arbeitsschritte sind unter Kapitel 3.2.3.2. beschrieben. Zum Vergleich wurde ein Präparations-Set<sup>25</sup>

<sup>25</sup> RNeasy Midi Kit, Qiagen



gemäß Herstellerprotokoll verwendet, bei welchem die Extraktion der RNA mit Hilfe einer Säule stattfindet, an die die RNA gebunden wird (Methode 2). Die Zerkleinerung und Homogenisierung der gefrorenen Proben geschah bei beiden Methoden gleich. Es handelte sich bei den Proben um Gewebestücke gleichen Gewichts, die von in graviden Schlachttieren stammten.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte in beiden Fällen photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Tabelle 4.3.1 zeigt die Ergebnisse für verschiedene Präparationen.

Tabelle 4.3.1: Ergebnisse der photometrischen Bestimmung der Konzentration an Gesamt-RNA aus Vaginalgewebe von Schafen aus zwei verschiedenen Isolations-Methoden.

Probe	Methode	RNA-Konzentration in H <sub>2</sub> O
1	1	0,220 µg/µl
2	1	0,400 µg/µl
3	2	0,012 µg/µl
4	2	0,005 µg/µl

Der Vergleich der Resultate beider Methoden zeigte deutlich, daß für die Isolation von Gesamt-RNA aus Vaginalgewebe das Säulen-Verfahren eine zu geringe Ausbeute für die nachfolgenden Schritte erbrachte (Methode 2). Aus diesem Grund wurden die RNA-Präparationen in der vorliegenden Arbeit durch die Fällungsreaktion mittels Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol durchgeführt (Methode 1).

#### 4.3.1.2. Optimierung der PCR-Bedingungen

Ausgehend von den nach McGRAW et al. (1990) berechneten Annealing-Temperaturen ( $T_{an}$ ) wurde für jedes Primerpaar die optimale Temperatur in einer PCR mit Temperatur-Gradient ermittelt. Der Gradient setzte sich aus dem Durchschnitt der  $T_{an}$  des jeweiligen upstream- und downstream-Primer  $\pm 2$  °C zusammen. Die Dauer der PCR wurde mit 30 Zyklen so gewählt, daß sichtbare

Amplifikatmengen mit großer Wahrscheinlichkeit zu erwarten waren. Als Parameter der Effektivität der PCR diene der optische Vergleich der Intensität der Amplifikatbanden auf einem EthBr-gefärbten Agarosegel. In Tabelle 4.3.2 sind die errechneten und die experimentell ermittelten Temperaturen gegenübergestellt, wobei deutlich wird, daß in den meisten Fällen die durchschnittliche Temperatur aus beiden Primern verwendet werden konnte.

Tabelle 4.3.2 Gegenüberstellung der berechneten und der experimentell ermittelten, optimalen Annealing-Temperaturen ( $T_{an}$ ) der einzelnen Primerpaare.

Molekül		$T_{an}$ berechnet	$T_{an}$ experimentell ermittelt
GAPHD	Upstream-Primer	60,6 °C	61 °C
	Downstream-Primer	61,2 °C	
ER $\alpha$	Upstream-Primer	66,6 °C	61 °C
	Downstream-Primer	60,4 °C	
COL1 A2	Upstream-Primer	62,5 °C	62 °C
	Downstream-Primer	62, 9 °C	
MMP 1	Upstream-Primer	61,7 °C	62 °C
	Downstream-Primer	61, 1 °C	
TIMP 1	Upstream-Primer	62,9 °C	62 °C
	Downstream-Primer	62,2 °C	

#### 4.3.1.3. Festlegung der Zyklenzahl zur Bestimmung der exponentiellen Amplifizierungsphase

Zur Festlegung der Anzahl an Zykluswiederholungen, in der eine exponentielle Amplifizierung der PCR-Produkte stattfindet, wurden für jedes zu untersuchende Molekül PCR-Durchgänge mit einer ansteigenden Zahl an Zyklen durchgeführt. Die Intensität der Amplifikatbanden wurde nach 24, 27, 30, 33 Zyklen densitometrisch gemessen und in einer Graphik aufgetragen. Exemplarisch sind in Abbildung 4.3.1 die Ergebnisse der Zyklusbestimmungen für die Expression des Östrogenrezeptors  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) und der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I (COL1 A2) auf einem EthBr-gefärbten Agarosegel unter UV-Licht dargestellt.

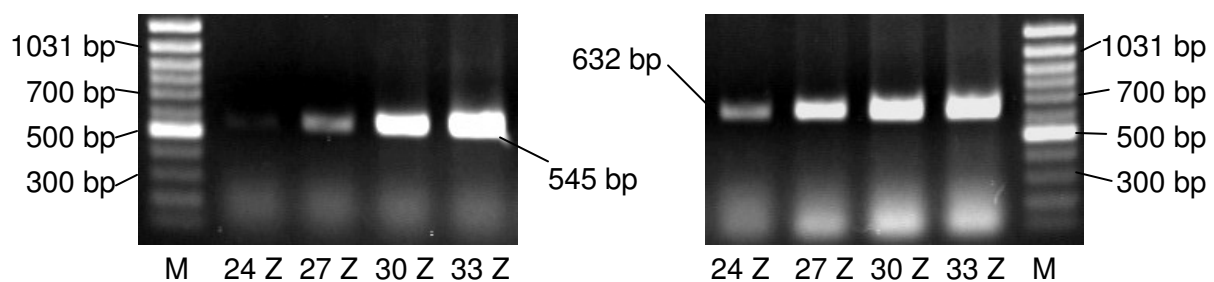


Abbildung 4.3.1 Ermittlung der exponentiellen Amplifikationsphase während einer PCR für die Primer des ER  $\alpha$  (linkes Bild) und des COL1 A2 (rechtes Bild) mit cDNA aus ovinem Vaginalgewebe. M = Größenstandard Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus<sup>26</sup>, Z = Zyklen.

In der graphischen Auftragung der Daten aus der optischen Dichtemessung gegen die Zyklusfrequenz ergab sich das typische Bild einer Sättigungskurve. Es wurde diejenige Anzahl an Zykluswiederholungen ausgewählt, die in der nahezu linearen Anstiegsphase des Graphen lag, in der eine exponentielle Vermehrung der PCR-Produkte zu erwarten war. Die zugehörigen densitometrischen Meßwerte des Agarosegels aus Abbildung 4.3.1 sind in Abbildung 4.3.2 graphisch dargestellt.

<sup>26</sup> MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot

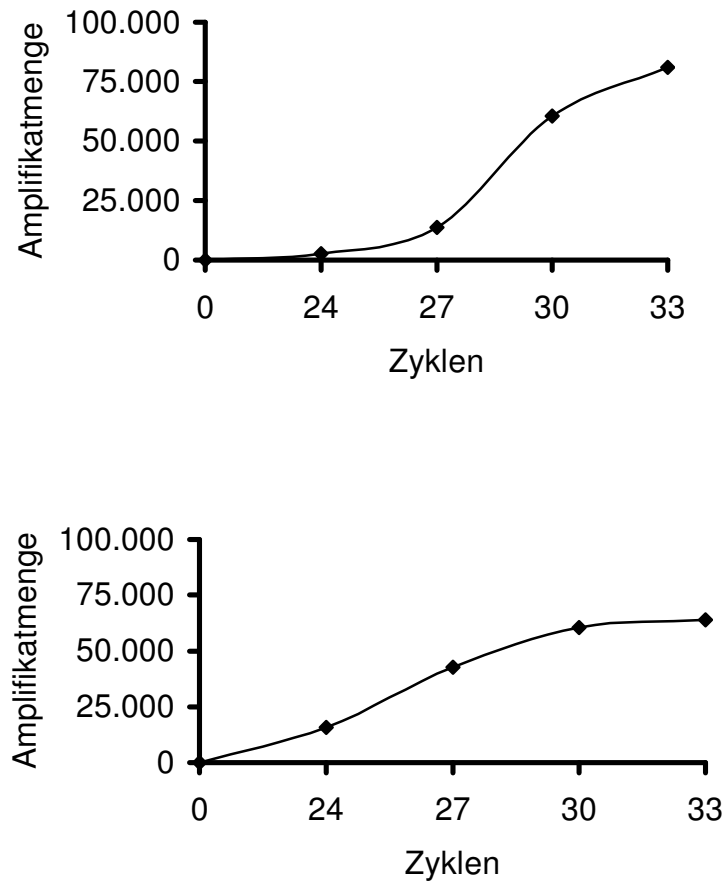


Abbildung 4.3.2 Graphische Darstellung der Meßwerte aus der optischen Dichtebestimmung für ER  $\alpha$  (oben) und COL1 A2 (unten) in ovinem Vaginalgewebe. Anhand des Kurvenverlaufs wurden für beide Primerpaare 28 Zyklen in den folgenden Experimenten verwendet.

### 4.3.2. Hauptversuche

Aufgrund einer schlechten Qualität und einer zu geringen Menge RNA wurde die Probe eines Schafes der Gruppe 1 verworfen. Da der Vergleich der mRNA-Expression sehr störanfällig ist, wurden nur Tiere miteinander verglichen, bei denen die RT-PCR und die Gelelektrophorese an einem Tag in 2 PCR-Durchläufen erfolgte. Aus diesen Forderungen ergeben sich folgende Gruppenvergleiche:

- Tiere mit intakter Hochgravidität (Gruppe 1, n = 4) und Schafen mit einem *Prolapsus vaginae ante partum* (Gruppe 3A, n = 3)
- Probanden i.p. unmittelbar nach der Expulsion des letzten Lammes (Gruppe 2, n = 4) und Schafen mit einem *Prolapsus vaginae ante partum* (Gruppe 3B, n = 3).

Aufgrund der hohen Streuung der Ergebnisse wurden zur Datenbeschreibung die geometrischen Mittelwerte ( $\bar{x}_g$ ) und die Streufaktoren (SF) verwendet. Da die Einheiten der Expressionsraten keine absoluten Meßwerte der cDNA-Moleküle darstellen, werden die Ergebnisse dimensionslos angegeben.

#### 4.3.2.1. Expression der mRNA von Kollagen I

Die Expression der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I weist Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abbildung 4.3.3). Bei Schafen mit einem *Prolapsus vaginae ante partum* wird im Mittel eine statistisch signifikant geringere mRNA-Expression im Vergleich zu Tieren mit einer ungestörten Hochträchtigkeit festgestellt ( $p < 0,01$ ). Schafe *intra partum* und Probanden mit einem antepartalen Vaginalprolaps zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede der Expressionsraten (Tabelle 4.3.3., Abbildung 4.3.4).

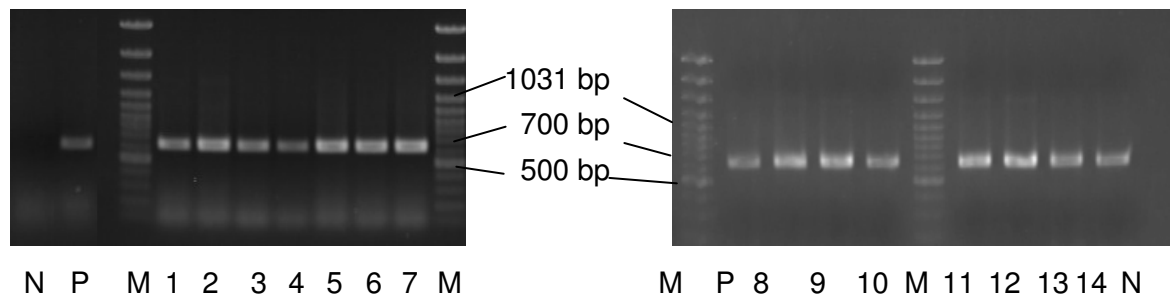


Abbildung 4.3.3 Darstellung der Amplifikatbanden für die  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I auf einem EthBr-gefärbten Agarosegel. Links: 4 gesunde, hochtragende Schafe (Spuren 1 - 4) und 3 Tiere mit *Prolapsus vaginae* a.p. (Spuren 5 - 7). Rechts: 4 gesunde Schafe i.p. (Spuren 8 - 11) und 3 Tiere mit antepartalem Vaginalprolaps (Spuren 12 - 14). Fragmentgröße 632 bp; M = Größenstandard Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus<sup>26</sup>, N = Negativkontrolle, P = Positivkontrolle (Schafleber)

Tabelle 4.3.3 Expression der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I in ovinem Vaginalgewebe von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3A und 3B). Die Unterschiede zwischen Gruppe 1 und 3A erweisen sich als statistisch signifikant (a zu b:  $p < 0,01$ ).

Gruppe	Proband	Expression der $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I		
		Einzelwerte	$\bar{x}_g$ / SF	Min/Max Spannweite
1 ungestörte Trächtigkeit	1	6,84	1,353 / 80,590 <sup>a</sup>	0,0022/44,63 44,628
	2	0,0022		
	3	44,63		
	4	5,01		
2 <i>intra partum</i>	1	4,7900	4,626 / 1,115	3,4674/6,1665 2,699
	2	6,1665		
	3	4,4712		
	4	3,4674		
3A <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	0,00000120	0,0000005 / 2,12 <sup>b</sup>	0,00000027/ 0,00000120 0,00000093
	2	0,00000048		
	3	0,00000027		
3B <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	1,8198	0,934 / 1,344	0,1586/2,8200 2,661
	2	0,1586		
	3	2,8200		

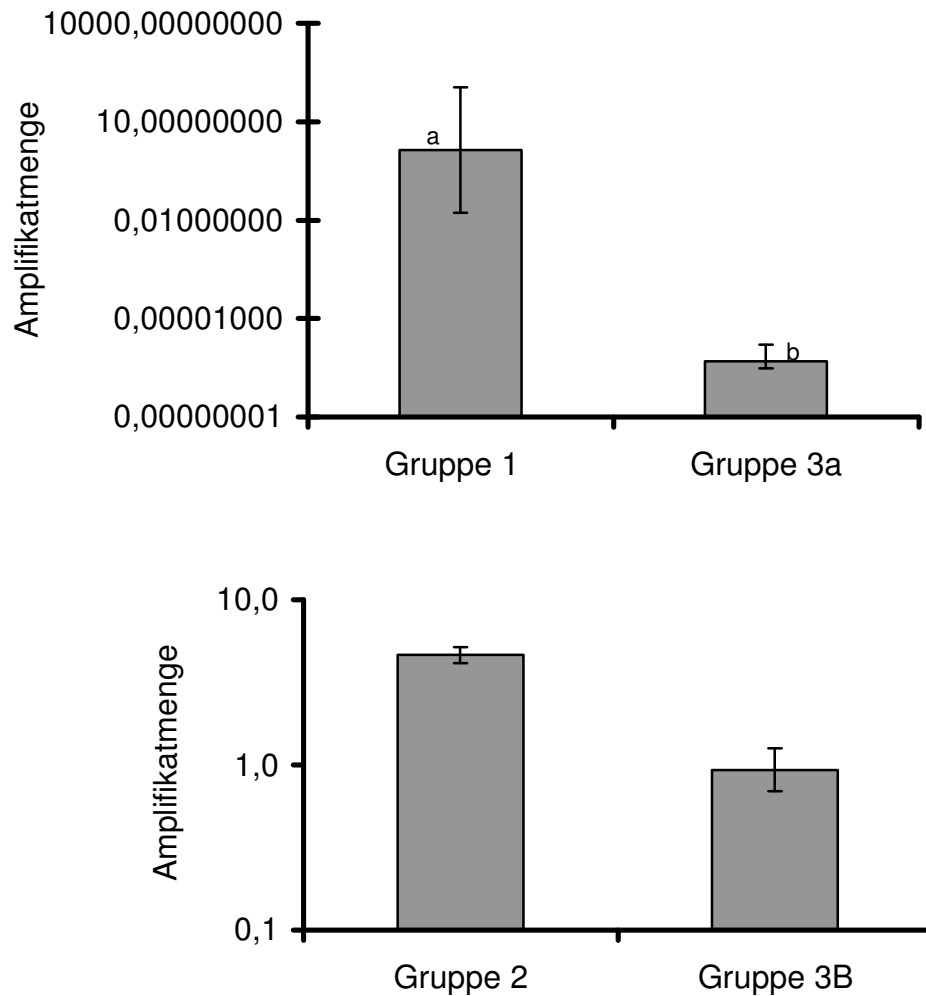


Abbildung 4.3.4 Darstellung der Expressionsrate der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I in Form der Mittelwerte der Amplifikatmengen ( $\bar{x}_g/SF$ ). Oben: Hochgravide, gesunde Schafe (Gruppe 1) und Tiere mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3A). Der Unterschied erweist sich als statistisch signifikant (a zu b:  $p < 0,01$ ). Unten: Probanden i.p. (Gruppe 2) und Schafe mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3B). Der Gruppenunterschied ist statistisch nicht signifikant.



#### 4.3.2.2. Expression der mRNA der MMP1 und des TIMP 1

##### *MMP 1*

Hinsichtlich der mRNA-Expression der MMP1 konnten bei 28 Zyklen nur bei Schafen mit einem antepartalen *Prolapsus vaginae* und bei der Gruppe i.p. positive Signale nachgewiesen werden. In Gruppe 1 konnten keine Amplifikatbanden auf den EthBr-gefärbten Agarosegel identifiziert werden (Abbildung 4.3.5). Durch eine Erhöhung der Zykluswiederholungen auf 30 Zyklen gelang es jedoch, eine sichtbare Amplifikatmenge zu erhalten (Abbildung 4.3.6). Dies bedeutet, daß das negative Ergebnis bei 28 Zyklen nicht auf eine Degradierung des Templates zurückzuführen ist, sondern auf die geringe Menge der spezifischen mRNA. Aufgrund der geringen Gruppengröße erweist sich der Unterschied jedoch als statistisch nicht signifikant. Im Vergleich zu Schafen i.p. zeigen Tiere mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. eine geringere, aber statistisch nicht signifikante, mittlere Expressionsrate (Tabelle 4.3.4. und Abbildung 4.3.7)

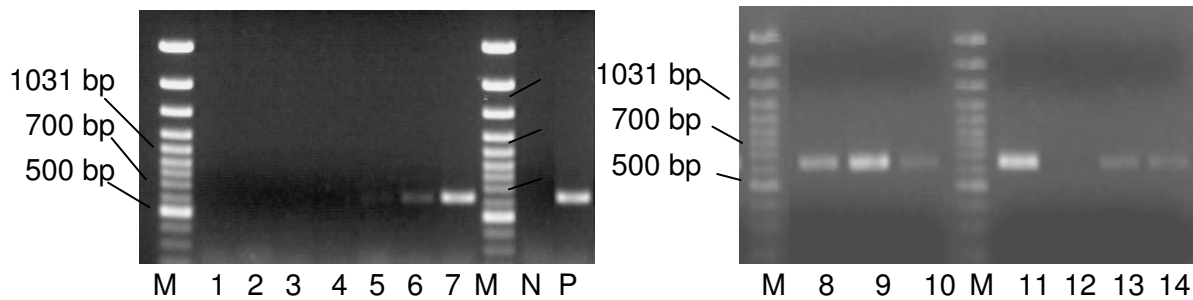


Abbildung 4.3.5 Darstellung der Amplifikatbanden der MMP 1 auf einem EthBr-gefärbten Agarosegel. Links: 4 gesunde, hochtragende Schafe (Spuren 1 - 4) und 3 Tiere mit *Prolapsus vaginae* a.p. (Spuren 5 - 7). Rechts: 4 gesunde Schafe i.p. (Spuren 8 - 11) und 3 Tiere mit antepartalem Vaginalprolaps (Spuren 12 - 14). Fragmentgröße 632 bp; M = Größenstandard Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus<sup>26</sup>, N = Negativkontrolle, P = Positivkontrolle (Schafleber).

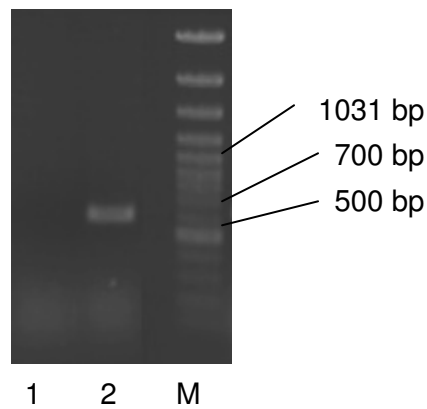


Abbildung 4.3.6 Darstellung der Amplifikatbanden der MMP 1 auf einem EthBr-gefärbten Agarosegel eines gesunden, hochtragenden Schafes bei 28 Zyklen (Spur 1) und 30 Zyklen (Spur 2). Fragmentgröße 632 bp; M = Größenstandard Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus<sup>26</sup>

Tabelle 4.3.4 Expression der MMP 1 in ovinem Vaginalgewebe von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3A und 3B). Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind statistisch nicht signifikant.

Gruppe	Proband	Expression der MMP 1		
		Einzelwerte	$\bar{x}_g$ / SF	Min/Max Spannweite
1 ungestörte Trächtigkeit	1	<21*	<21*	
	2	<21*		
	3	<21*		
	4	<21*		
2 <i>intra partum</i>	1	3.853,705	4.173,496 / 1,300	3.019,659/ 5.520,649 2.500,99
	2	5.520,649		
	3	3.019,659		
	4	4.724,674		
3A <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	<21*	240,769 / 10,046	<21*/ 2.065,261 2.044,261
	2	321,723		
	3	2.065,261		
3B <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	1.850,208	481,948 / 15,205	1.850,208/ 2.880,411 1.030,203
	2	2.880,411		
	3	1.850,208		

\* = unterhalb der unteren, technisch möglichen Meßwertgrenze; zur weiteren Berechnung wurde der Wert 21 verwendet

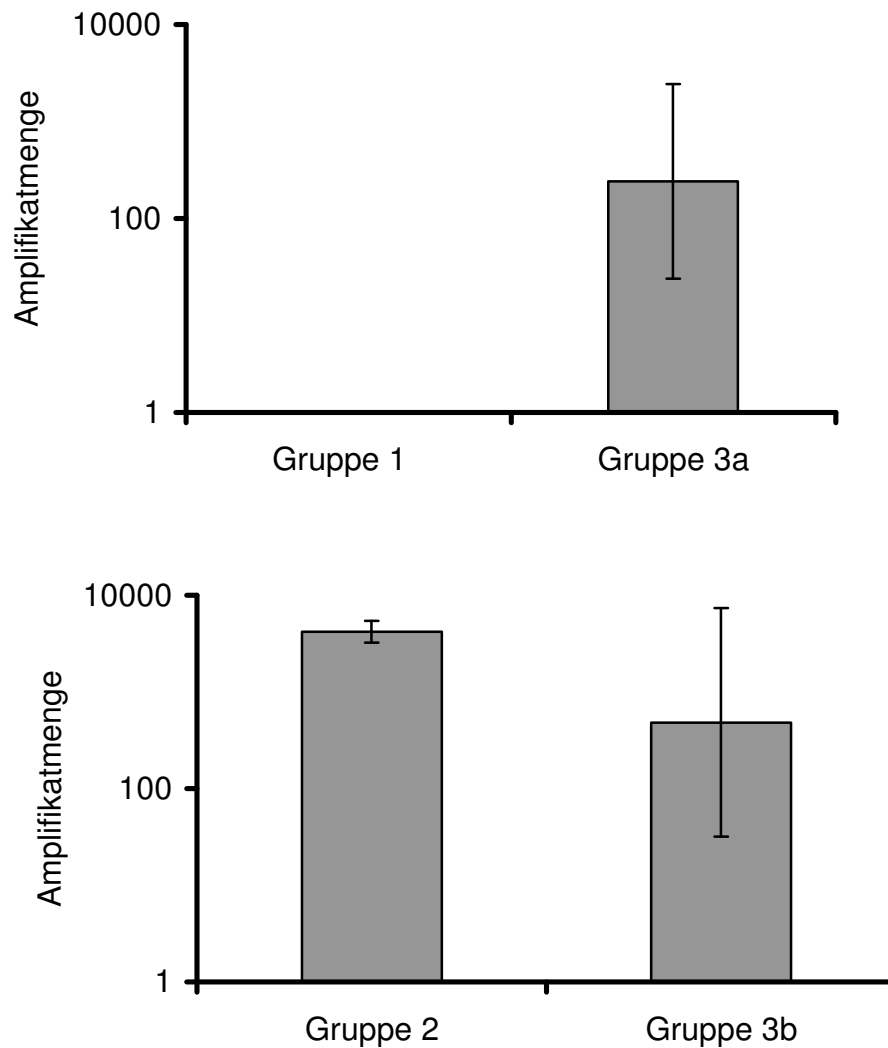


Abbildung 4.3.7 Expressionsrate der MMP 1 dargestellt in  $\bar{x}_g$  und SF. Oben: Hochgravide, gesunde Schafe (Gruppe 1) und Tiere mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3A). Unten: Probanden i.p. (Gruppe 2) und Schafe mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3B). Die Gruppenunterschiede erweisen sich als statistisch nicht signifikant.

*TIMP 1*

Die mittlere Expressionsrate des TIMP 1 weist bei Tieren der Gruppe 1 ein höheres Niveau auf als bei Schafen mit einem antepartalen Scheidenvorfall (Abbildung 4.3.8 links). Der Unterschied stellt sich als statistisch nicht signifikant dar. Der Gruppenvergleich zwischen gesunden Tieren *intra partum* und Probanden mit einem Vaginalprolaps ergibt nur einen geringen Unterschied des Mittelwertniveaus (Abbildung 4.3.8 rechts), wobei keine statistisch signifikante Differenz besteht (Abbildung 4.3.9).

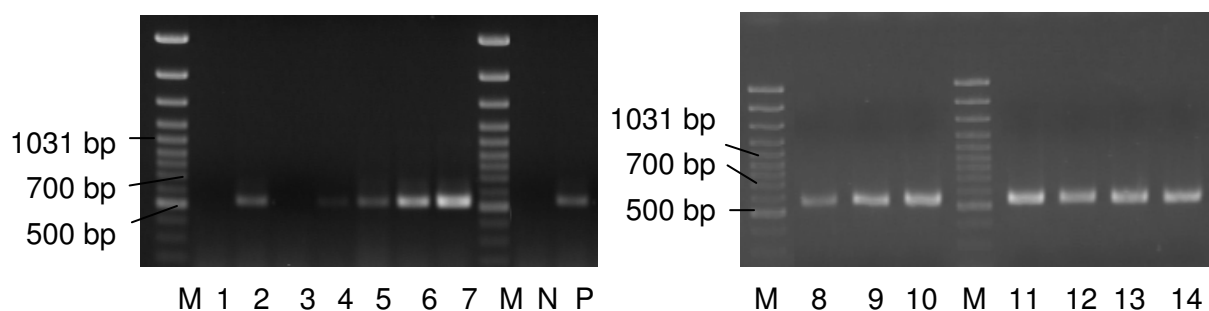


Abbildung 4.3.8 Darstellung der Amplifikatbanden des TIMP 1 auf einem EthBr-gefärbten Agarosegel. Links: 4 gesunde, hochtragende Schafe (Spuren 1 - 4) und 3 Tiere mit *Prolapsus vaginae* a.p. (Spuren 5 - 7). Rechts: 4 gesunde Schafe i.p. (Spuren 8 - 11) und 3 Tiere mit antepartalem Vaginalprolaps (Spuren 12 - 14). Fragmentgröße 530 bp; M = Größenstandard Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus<sup>26</sup>, N = Negativkontrolle, P = Positivkontrolle (Schafleber)

Tabelle 4.3.5 Expression der TIMP 1 in ovinem Vaginalgewebe von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3A und 3B). Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind statistisch nicht signifikant.

Gruppe	Proband	Expression der TIMP 1		
		Einzelwerte	$\bar{x}_g$ / SF	Min/Max Spannweite
1  ungestörte Trächtigkeit	1	<0,0000004	0,000366 / 5.890,096	0,0000004/ 29,4750 29,4749
	2	0,0038		
	3	<0,0000004		
	4	29,4750		
2  <i>intra partum</i>	1	113,3134	527,305 / 6,871	113,3134/ 8.834,6536 8.723,340
	2	302,7698		
	3	8.834,6536		
	4	255,0717		
3A  <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	0,00000152	0,0000178 / 11,092	0,0000015/ 0,000186 0,000185
	2	0,0000201		
	3	0,000186		
3B  <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	61,3369	430,399 / 6,368	61,3369/ 2.438,5162 2.377,1793
	2	533,0486		
	3	2.438,5162		

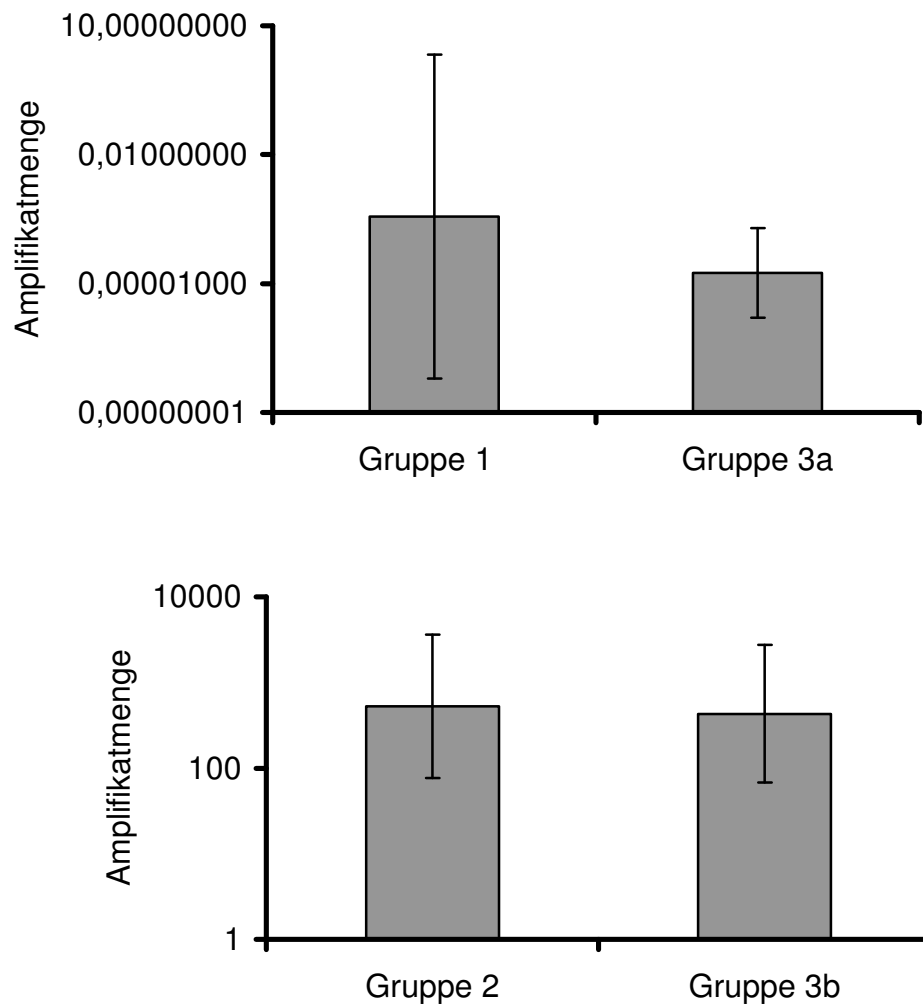


Abbildung 4.3.9 Expressionsrate des TIMP 1 im Form von  $\bar{x}_g$  und SF. Oben: Hochgravide, gesunde Schafe (Gruppe 1) und Tiere mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3A). Unten: Probanden i.p. (Gruppe 2) und Schafe mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3B). Die Gruppenunterschiede erweisen sich als statistisch nicht signifikant.



#### 4.3.2.3. Expression der mRNA des Östrogenrezeptors $\alpha$

Die Expression des Östrogenrezeptors  $\alpha$  weist eine deutliche Variation zwischen den Gruppen auf (Abbildung 4.3.10). Der geometrische Mittelwert der Expressionsrate liegt bei Tieren mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. gegenüber gesunden, hochtragenden Schafen statistisch signifikant niedriger ( $p < 0,01$ ). Zwar fällt das mittlere Expressionsniveau bei den erkrankten Schafen im Vergleich zu gesunden Probanden i.p. tendenziell ebenfalls geringer aus, der Unterschied stellt sich jedoch als statistisch nicht signifikant heraus (Tabelle 4.3.6. und Abbildung 4.3.11).

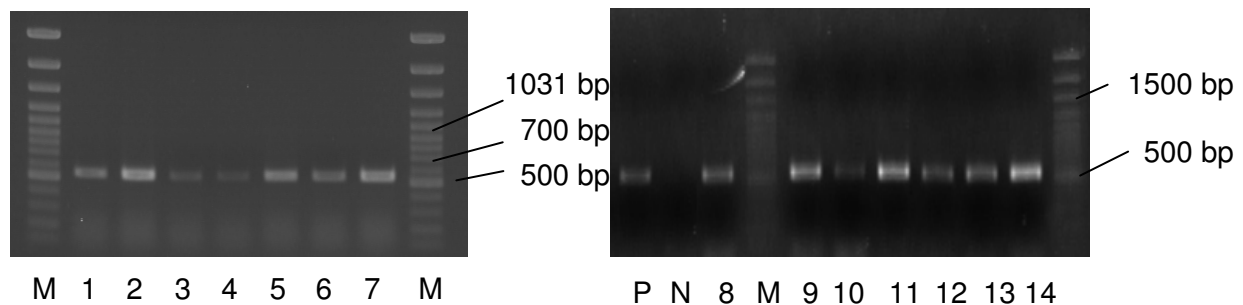


Abbildung 4.3.10 Darstellung der Amplifikatbanden des Östrogenrezeptors  $\alpha$  auf einem EthBr-gefärbten Agarosegel. Links: 4 gesunde, hochtragende Schafe (Spuren 1 - 4) und 3 Tiere mit *Prolapsus vaginae* a.p. (Spuren 5 - 7). Rechts: 4 gesunde Schafe i.p. (Spuren 8 - 11) und 3 Tiere mit antepartalem Vaginalprolaps (Spuren 12 - 14). Fragmentgröße 545 bp; M = Größenstandard Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus<sup>26</sup>, N = Negativkontrolle, P = Positivkontrolle (Schafleber)

Tabelle 4.3.6 Expression des Östrogenrezeptors  $\alpha$  in ovinem Vaginalgewebe von Schafen mit ungestörter Hochträchtigkeit (Gruppe 1), *intra partum* (Gruppe 2) und mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3A und 3B). Die Unterschiede zwischen den Gruppen 1 und 3A sind statistisch signifikant (a zu b: 0,01).

Gruppe	Proband	Expression des Östrogenrezeptors $\alpha$		
		Einzelwerte	$\bar{x}_g$ / SF	Min/Max Spannweite
1 ungestörte Trächtigkeit	1	33,1937	4,013 / 8,933 <sup>a</sup>	0,2112/ 33,1937 32,983
	2	0,2112		
	3	11,8700		
	4	3,1167		
2 <i>intra partum</i>	1	4,8419	9,015 / 3,027	3,3508/ 41,2576 37,907
	2	9,8667		
	3	3,3508		
	4	41,2576		
3A <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	0,00000669	0,0000022 / 2,123 <sup>b</sup>	0,00000039/ 0,00000669 0,0000063
	2	0,00000039		
	3	0,00000398		
3B <i>Prolapsus vaginae</i> a.p.	1	0,5802	0,793 / 9,078	0,1038/ 8,2796 8,176
	2	0,1038		
	3	8,2796		

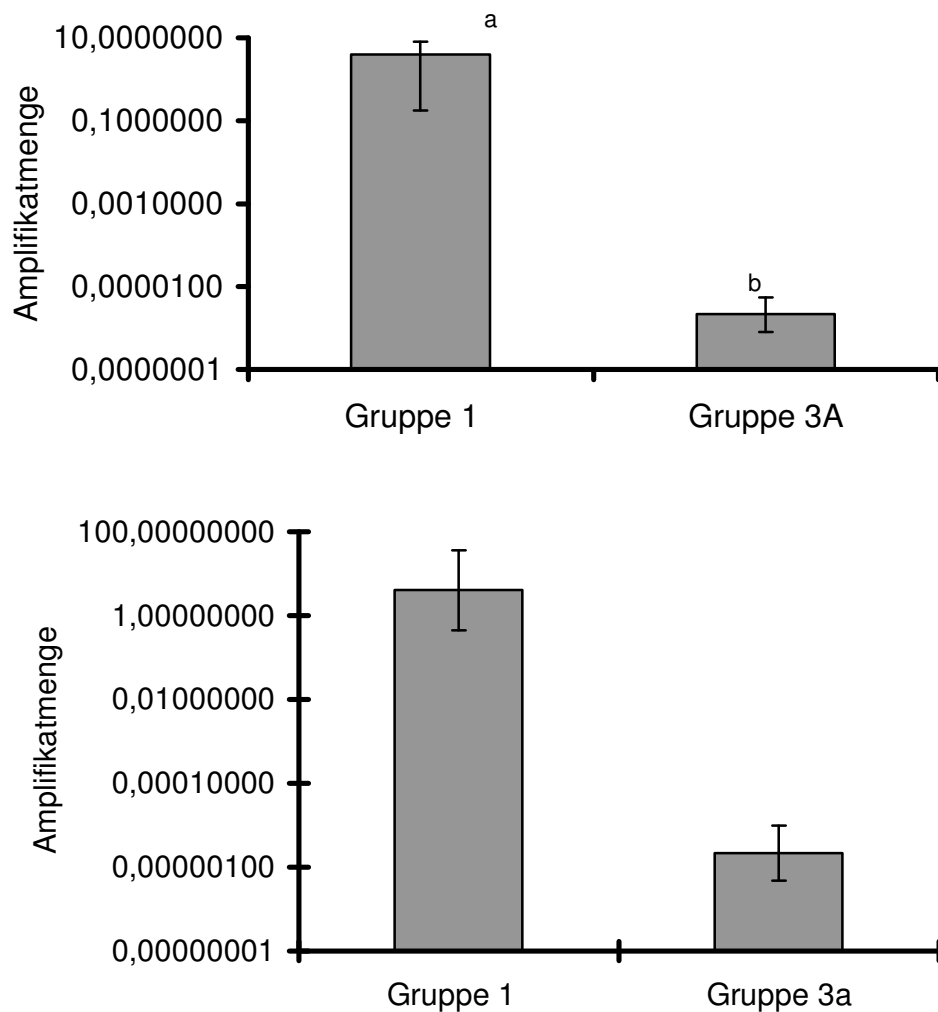


Abbildung 4.3.11 Expressionsrate des Östrogenrezeptors  $\alpha$  in Form von  $\bar{x}_g$  und SF. Oben: Hochgravide, gesunde Schafe (Gruppe 1) und Tiere mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3A). Der Unterschied ist statistisch signifikant (a zu b:  $p < 0,01$ ). Unten: Probanden i.p. (Gruppe 2) und Schafe mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. (Gruppe 3B). Der Gruppenunterschied erweist sich als statistisch nicht signifikant.

#### **4.3.2.4. Sequenzierung des cDNA-Fragments der $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I und des Östrogenrezeptor $\alpha$**

##### *$\alpha_2$ -Kette des Kollagen I*

Die Sequenzierung des Amplifikats der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I ergab ein Fragment mit einer Länge von 530 bp. Da die ovine Gensequenz bislang unbekannt war, konnte nur ein Vergleich mit speziesfremden Basenfolgen durchgeführt werden. Zu den Sequenzen von Rind (97%), Mensch (89%) und Hund (88%) bestand eine hohe Homologie, so daß mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden kann, daß es sich bei der ovinen cDNA um einen Abschnitt der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I handelt (Abbildung 4.3.12).

Sequenz	1	gcccgtggaagtgatggaagtgtgggtcctgtgggccctgctgggtcccattgggtctgcc	60
Rind	801	.....t	860
Mensch	797	.....c.....c.....t.....t	856
Hund	834	.....t.....t..c.....t	893
Sequenz	61	ggccctccaggcttcccagggtgctcctggccccaagggtgaacttggacctgttggtaac	120
Rind	861	.....c.....	920
Mensch	857	.....c.....a.....g.....	916
Hund	894	.....a.c.....	953
Sequenz	121	cctggccctgctgggtcccgcgggtccccgtgggtgaagtgggtcttccaggcctttctggc	180
Rind	921	.....c.....	980
Mensch	917	g...t.....c.....c.c...	976
Hund	954	..c..t.....tg...c...	1013
Sequenz	181	cctgttggacctcctggcaaccccgagccaatgggcttcctgggtgctaagggtgctgct	240
Rind	981	.....c.....a.....c.....	1040
Mensch	977	..c.....t..t..t.....a..c..c...a.....c.....	1036
Hund	1014	..c.....c.....t.....t.....c..c..ga.....	1073
Sequenz	241	ggccttcccgggtgttgctggggctcccggcctccctggaccccggggtattcctggccct	300
Rind	1041	.....	1100
Mensch	1037	.....c.....c.....	1096
Hund	1074	.....g.....c.....t.....t..g.....t...	1133
Sequenz	301	gttggtgctgccggagctactggcgccagaggacttggttggtgagcccggccagctggt	360
Rind	1101	.....c.....t..t.....	1160
Mensch	1097	.....t.....t.....t..t.....c	1156
Hund	1134	.....c..t..t.....t.....a.....t..g.....	1193

Sequenz	361	tcgaaaggagagagcggaacaagggagagcctggcgctggtggacagccaggctcctcct	420
Rind	1161	.....c.....t.....g.....	1220
Mensch	1157	..c.....t.....t.....c...t...c...g.cc.a.....	1216
Hund	1194	..c.....a..t.....t.....t...c...tgcc.a.....	1253
Sequenz	421	ggccccagtggtgaagaaggaaagagaggctccactggagaaatcggacccgctggcccc	480
Rind	1221	.....	1280
Mensch	1217	..t.....c.t.a...g...gct...t.t..c....t	1276
Hund	1254	..t.....c...a...t...gct...t.t....g...	1313
Sequenz	481	ccaggacctcctgggctgaggggaaatccaggctcccgtggtcttcctgg	530
Rind	1281	.....t.....a.....	1330
Mensch	1277	.....a..t.g...t..t..t.....	1326
Hund	1314	t.t.....a....g...t..t..t.....	1363

Abbildung 4.3.12 Ergebnis der Sequenzierung des amplifizierten ovinen Fragments im Vergleich zu bekannten Sequenzen der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I. Übereinstimmende Basen sind durch einen Punkt (.) dargestellt, abweichende Basen erscheinen als entsprechender Buchstabe (a = Adenosin, c = Cytidin, g = Guanidin, t = Thymin). Aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung stellt das cDNA Fragment mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Abschnitt der ovinen  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I dar.

*Östrogenrezeptor  $\alpha$* 

Für das Amplifikat des Östrogenrezeptor  $\alpha$  wurde eine Fragmentlänge von 475 bp ermittelt. Der computergestützte Sequenzvergleich lieferte für die bekannten Basenabfolgen vom Schaf eine 100%ige Übereinstimmung. Zu den Spezies Rind, Schwein und Hund bestand eine hochgradige Verwandtschaft (Rind: 98%, Schwein: 95%, Hund: 90%; Abbildung 3.2.1).

Sequenz	1	catctggtcagccgtcagggacaacaccgggctgttcttcttagtggtttaatcatgat	60
Schaf	1097	.....	1038
Rind	1100	.....t.....	1041
Schwein	945	.....g..t.....g.....a..g	886
Hund	649	.....a..g..t.....gg.t.....a..c.....a..g	590
Sequenz	61	cgggcttggccaaagggttggtagctctcatgtctccggagggcaccgcttcgttcctgcc	120
Schaf	1037	.....	978
Rind	1040	g.....c.....	981
Schwein	885	a.....c..a.....a.g.....a.....	826
Hund	589	a.....c...a..tc....ca.....a....a.c..a....a.....	530
Sequenz	121	ctccccatcatctctctggcgcttgtgcttcaacattctccctcctcttcggtctttccg	180
Schaf	977	.....	918
Rind	980	.....	921
Schwein	825	...t.....c.....	766
Hund	529	.....t.....t.....t.....	470
Sequenz	181	tatccccctttcatcatgcccacttcatagcacttgcgtagccggcaggcctgacagct	240
Schaf	917	.....	858
Rind	920	...t..g.....	861
Schwein	765	.....g.....	706
Hund	469	.....g.....a.....c.....a.....	410
Sequenz	241	cttccttctgtttttatcaattgtgcactgggttggtggccggacacatgtagtcattatg	300
Schaf	857	.....	798
Rind	860	.....c.....c.....	801
Schwein	705	.....c....c.....a..t.....	646
Hund	409	.....c....c.....a..t.....	350



Sequenz	301	tccttgaatacttctcttgaagaaggccttacagccctcgcaagaccaaactccgtaatg	360
Schaf	797	.....	738
Rind	800	.....	741
Schwein	645	.....a.....	586
Hund	349	.....a..g....g....a.....	290
Sequenz	361	gtagcctgaggcatagtcattgcacactgcacagtagcgggtctccttggcagattccat	420
Schaf	737	.....	678
Rind	740	.....a.....	681
Schwein	585	.....a.....	526
Hund	289	.....a.....c.....	230
Sequenz	421	ggccatgcttccttgtcactggtagtgccaatctctctctgccaccttgacgt	475
Schaf	677	.....	623
Rind	680	.....	630
Schwein	525	.....g.....	478
Hund	229	.....t....t.....	182

Abbildung 4.3.13 Sequenz des amplifizierten Fragments des ovinen Östrogenrezeptors  $\alpha$  im Vergleich zu bekannten Sequenzen des Östrogenrezeptors  $\alpha$ . Übereinstimmende Basen sind durch einen Punkt (.) dargestellt, abweichende Basen erscheinen als entsprechender Buchstabe (a = Adenosin, c = Cytidin, g = Guanidin, t = Thymidin).

#### **4.4. Histologische Ergebnisse**

##### **4.4.1. Allgemeine Beschreibung**

In allen ausgewerteten histologischen Präparaten ist der typische dreischichtige Aufbau der Vaginalwand aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, der *Lamina propria mucosae* und der *Tunica muscularis* zu erkennen (Abbildung 4.4.1).

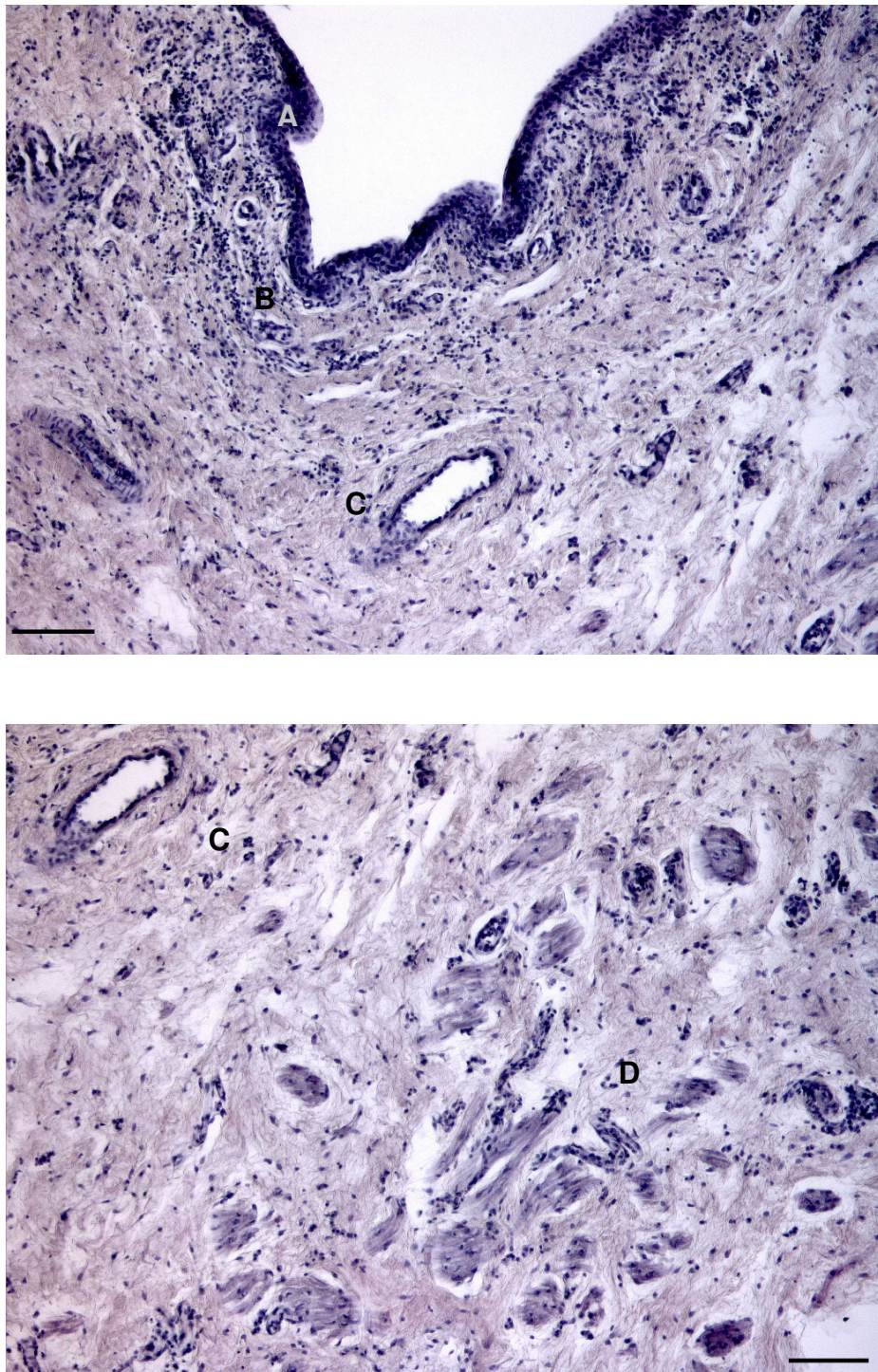


Abbildung 4.4.1 Histologischer Aufbau der Vaginalwand eines hochgraviden Schafes bestehend aus mehrschichtigem Plattenepithel (Zone I: A), *Lamina propria mucosae* (Zone II: B und III: C) und *Tunica muscularis* (Zone IV: D). Übersicht, HE, 100-fache Vergrößerung, Balkenlänge 100 µm.

Luminal befindet sich ein mehrschichtiges Plattenepithel, dessen Anzahl an Zellschichten zwischen den Gruppen variiert. Bei den Tieren der Gruppe 2 können nach Expulsion der letzten Frucht oberflächliche Epithelläsionen nachgewiesen werden, die sich in einem partiellen Verlust der obersten Epithelschicht darstellen. Des weiteren ist bei diesen Schafen in Bereichen intakter Oberflächen luminal eine leukozytenhaltige Schleimablagerung erkennbar, die nicht näher untersucht wurde. Mutmaßlich handelt es sich hierbei um Bestandteile des Fruchtwassers, da schleimproduzierende Zellen oder Drüsen dem Vaginalepithel fehlen. Lokal begrenzt findet i.p. eine Migration von Entzündungszellen von basal nach apikal durch das Epithel hindurch statt, die in den Gruppen 1 und 3 nicht zu beobachten ist (Abbildung 4.4.2).



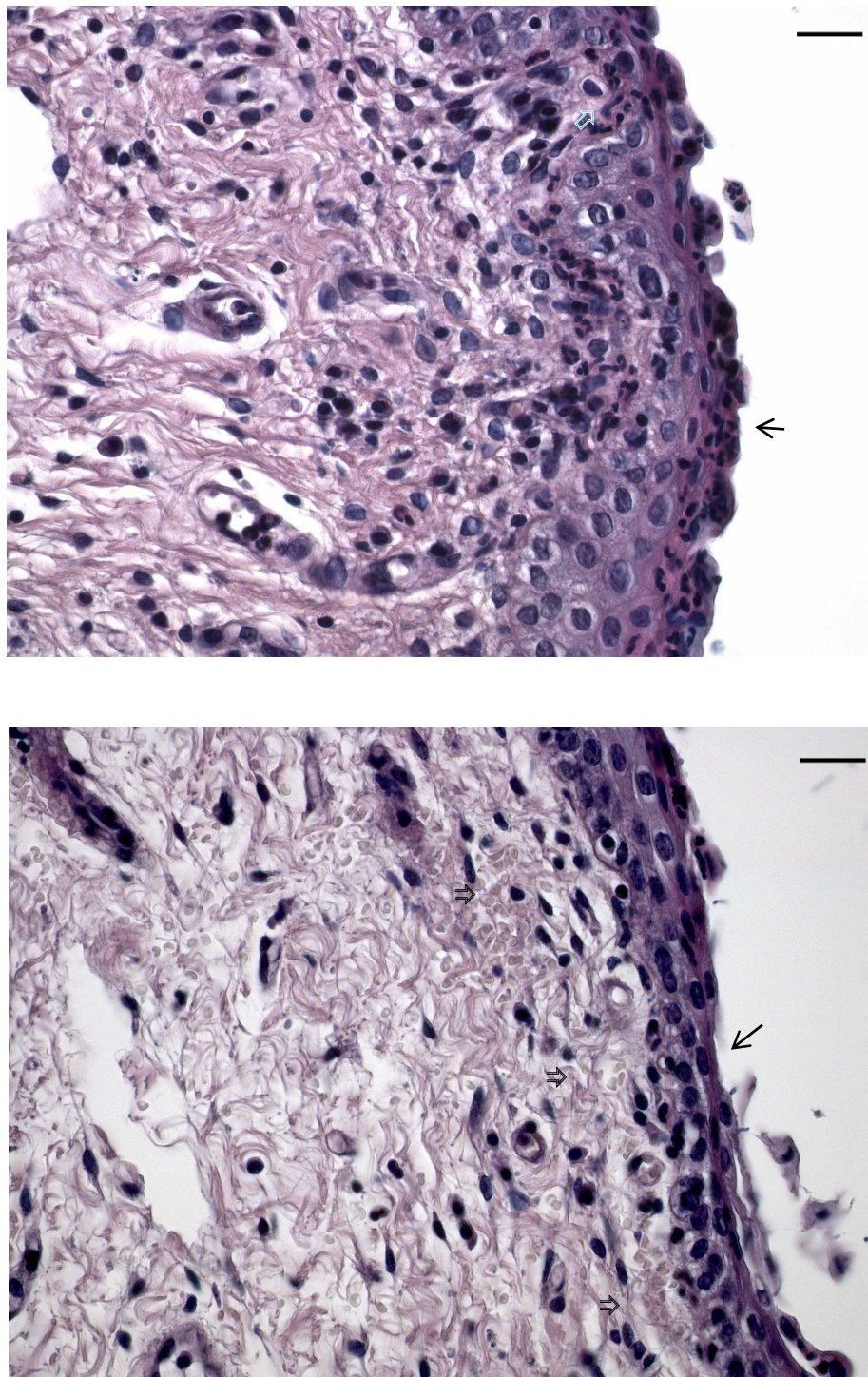


Abbildung 4.4.2 Oberes Bild: Oberflächliche Schleimablagerungen (↑) und transepitheliale Migration von Leukozyten (⇄).  
 Unteres Bild: Epithelläsionen (↑), subepitheliale Blutungen (⇄) in der Vaginalwand eines Schafes i.p., unmittelbar nach Expulsion der letzten Frucht. Übersicht, HE, 400-fache Vergrößerung, Balkenlänge 20 µm.

In der subepithelialen Schicht (Zone II) der *Lamina propria mucosae* lassen sich bei allen Gruppen gleichermaßen leukozytäre Infiltrate ausmachen, wobei mononukleäre Zellen überwiegen. Diese bilden stellenweise follikuläre Ansammlungen. Als weitere Zellpopulation können Neutrophile Granulozyten identifiziert werden. Subepitheliale Blutungen treten nur bei Schafen i.p. in Erscheinung (Abbildung 4.4.2). In Zone III können verschiedene Gefäßstrukturen innerhalb des Bindegewebes identifiziert werden. In dieser Schicht sind nur noch ganz vereinzelt Infiltrate mononukleärer Zellen vorhanden. In der Abbildung 4.4.3 ist stellvertretend für alle Gruppen ein leukozytärer Infiltrationsherd in der subepithelialen Zone eines hochgraviden Tieres dargestellt.

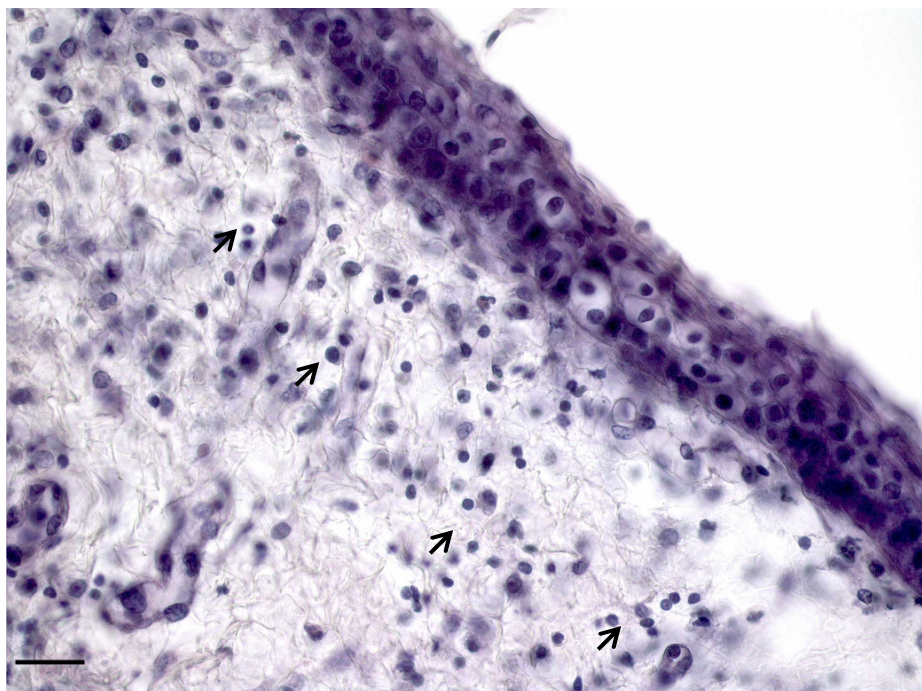


Abbildung 4.4.3 Leukozytäre Infiltrate (↑) im subepithelialen Bindegewebe der Vaginalwand bei einem hochgraviden Schaf. HE, 400-fache Vergrößerung, Balkenlänge 20 µm.

Anzeichen für eine gegenüber den Gruppen 1 und 2 verstärkte Ödematisierung des Bindegewebes in der *Lamina propria mucosae* werden bei Schafen mit einem antepartalen Vaginalprolaps nicht vorgefunden. Als Kriterium für eine Ödematisierung des Gewebes galt ein vergrößerter Abstand der Bindegewebsfasern durch einen vermehrten Flüssigkeitsgehalt im Interzellularraum.

Von der *Tunica muscularis* (Zone IV) ist in allen Präparaten nur die *Lamina muscularis circularis* erhalten. Die schwächere *Lamina muscularis longitudinalis* sowie die *Tunica serosa* beziehungsweise die *Adventitia* fehlen ganz.

#### 4.4.2. Morphologie des Epithels

Zur Deskription der Daten der Epithelhöhe werden der geometrische Mittelwert ( $\bar{x}_g$ ) und der Streufaktor (SF) angegeben. Bei der Auswertung der Anzahl der Epithelzellschichten fanden der arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}_a$ ) und die Standardabweichung (SD) Anwendung.

Hinsichtlich der Epithelhöhe kann ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen aufgezeigt werden ( $p < 0,0001$ ). Bei hochgraviden Schafen (Gruppe 1) wird eine durchschnittliche Höhe des Epithels von 31,12  $\mu\text{m}$  (SF 1,22) ermittelt. Die Gruppe 2 (i.p.) weist eine mittlere Epitheldicke von 33,27  $\mu\text{m}$  (SF 1,24) auf. Bei den Tieren mit *Prolapsus vaginae ante partum* (Gruppe 3) beträgt die Epithelhöhe im Durchschnitt 83,95  $\mu\text{m}$  (SF 1,21 ;Tabelle 4.4.1 und Abbildung 4.4.4).

Tabelle 4.4.1 Ergebnisse der Messungen der Epithelhöhe in oviner Vaginalschleimhaut unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit. Angegeben sind der geometrische Mittelwert ( $\bar{x}_g$ ) und der Streufaktor (SF). Die Unterschiede zwischen den Gruppen erweisen sich als hoch signifikant (a zu b:  $p < 0,0001$ ).

Gruppe	Proband	Epithelhöhe ( $\mu\text{m}$ )		
		Einzelwerte	$\bar{x}_g$ / SF	Min/Max Spannweite
1  ungestörte Trächtigkeit	1	24,55	31,12 <sup>a</sup> / 1,22	24,55 / 40,76 16,21
	2	40,74		
	3	26,95		
	4	31,13		
	5	34,77		
2  <i>intra partum</i>	1	27,60	33,27 <sup>a</sup> / 1,24	27,60 / 43,81 16,21
	2	28,20		
	3	35,95		
	4	43,81		
3  <i>Prolapsus vaginae a.p.</i>	1	84,24	83,95 <sup>b</sup> / 1,21	62,57/ 108,41 45,84
	2	108,41		
	3	77,84		
	4	96,04		
	5	81,77		
	6	62,57		



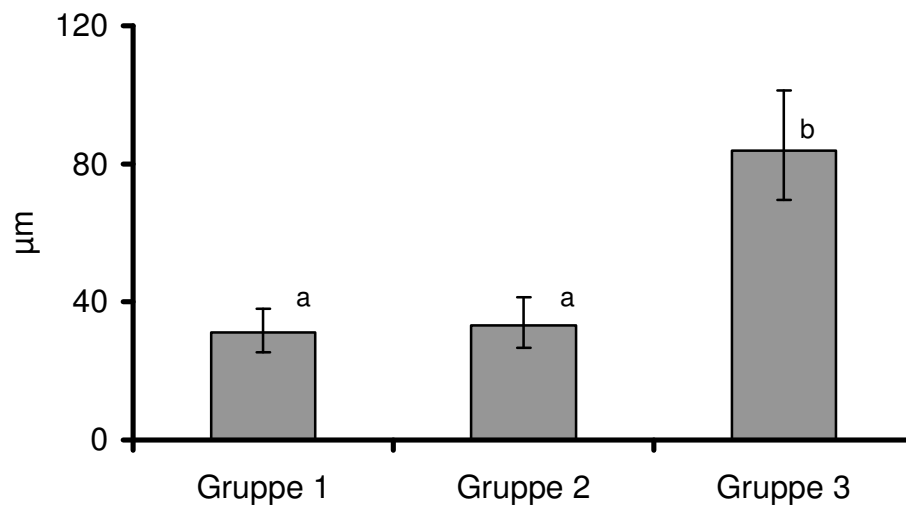


Abbildung 4.4.4 Vergleichende Darstellung der Epithelhöhe in oviner Vaginalschleimhaut. Angegeben sind der geometrischer Mittelwert ( $\bar{x}_g$ ) und der Streufaktor (SF). Die Unterschiede zwischen den Gruppen erweisen sich als hoch signifikant (a zu b:  $p < 0,0001$ ).

Weitere gruppenspezifische Besonderheiten bestehen in der Anzahl der Epithelschichten. In Gruppe 1 können im Durchschnitt  $4,75 \pm 0,71$  Zellschichten identifiziert werden. Ein ähnliches Mittel ergibt sich mit  $4,25 \pm 0,35$  Zellschichten für die Gruppe 2. Mit durchschnittlich  $6,58 \pm 0,30$  Zellschichten sind in der Gruppe 3 mehr Lagen von Epithelzellen übereinander angeordnet als in Gruppe 1 und 2 (Tabelle 4.4.2 und Abbildung 4.4.5). Dieser Unterschied erweist sich als hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ).

Tabelle 4.4.2 Ergebnisse der Auswertung der Anzahl an Epithelzellschichten in den 3 Probandengruppen. Es werden der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}_a$ ) und die Standardabweichung (SD) angegeben. Die Unterschiede stellen sich statistisch hoch signifikant dar (a zu b:  $p < 0,0001$ ).

Gruppe	Proband	Epithelzellschichten		
		Einzelwerte	$\bar{x}_a \pm SD$	Min/Max Spannweite
1  ungestörte Trächtigkeit	1	4	$4,75^a \pm 0,71$	4 / 5,25 1,25
	2	5,5		
	3	4		
	4	5		
	5	5,25		
2  <i>intra partum</i>	1	3,75	$4,25^a \pm 0,35$	3,75 / 4,5 0,75
	2	4,5		
	3	4,5		
	4	4,25		
3  <i>Prolapsus vaginae a.p.</i>	1	6,25	$6,58^b \pm 0,30$	6,25 / 7 0,75
	2	7		
	3	6,75		
	4	6,5		
	5	6,75		
	6	6,25		

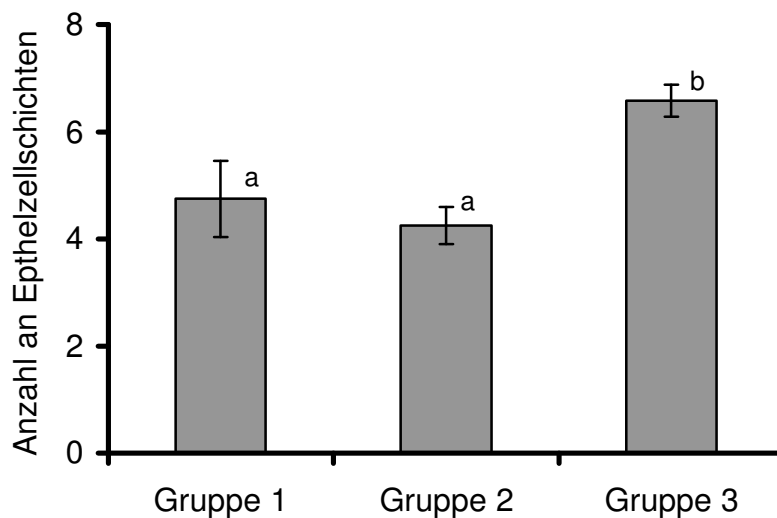


Abbildung 4.4.5 Vergleichende Darstellung der Anzahl der Epithelzellschichten in oviner Vaginalschleimhaut. Angegeben sind der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}_a$ ) und die Standardabweichung (SD). Die Unterschiede zwischen den Gruppen erweisen sich als hoch signifikant (a zu b:  $p < 0,0001$ ).

Eine morphologische Unterteilung des Epithels in *Stratum superficiale*, *Stratum intermedium* und *Stratum basale* kann in allen Präparaten der drei Gruppen vorgefunden werden. Beispielhaft ist in Abbildung 4.4.6 das Oberflächenepithel der Vaginalwand eines Schafes intra partum dargestellt.

Die Epithelzellen des luminal gelegenen *Stratum superficiale* stellen sich dorso-ventral abgeflacht dar und besitzen einen kleinen Zellkern und ein gleichmäßig angefärbtes Zytoplasma (A in Abbildung 4.4.6). In den Gruppen 1 und 3 besteht dieser oberste Abschnitt lichtmikroskopisch aus zwei Zellschichten. Bei den Schafen *intra partum* ist die oberste Zelage an mehreren Stellen abgetrennt, in intakten Bezirken sind jedoch auch in dieser Gruppe zwei Zellagen zu identifizieren (Abbildung 4.4.6).

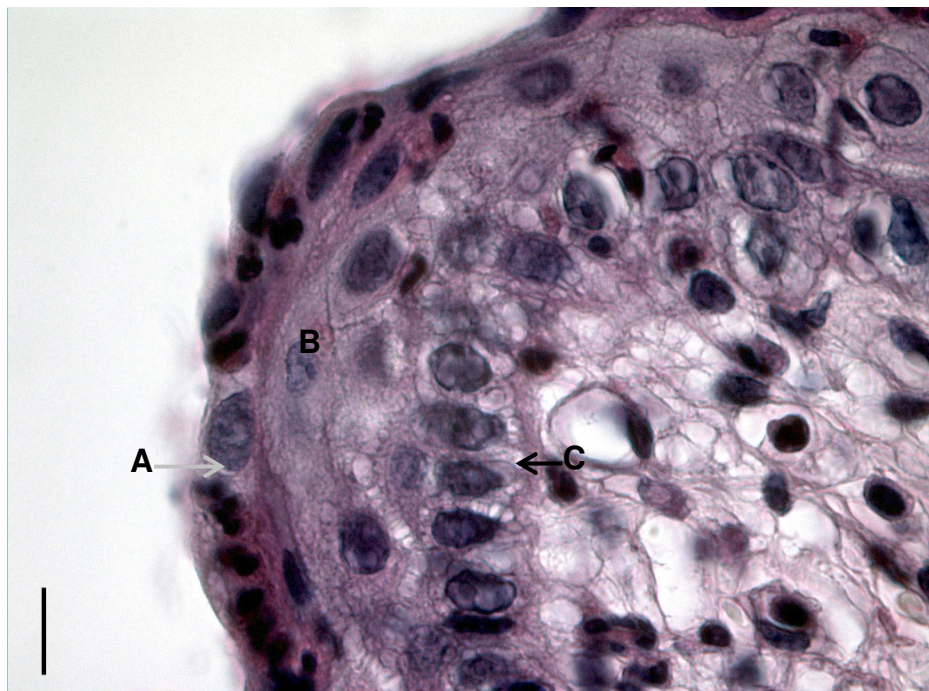


Abbildung 4.4.6 *Stratum superficiale* (A), *Stratum intermedium* (B), *Stratum basale* (C) des Oberflächenepithels in der Vaginalwand eines Schafes i.p. HE, 1000-fache Vergrößerung, Balkenlänge 10 μm.

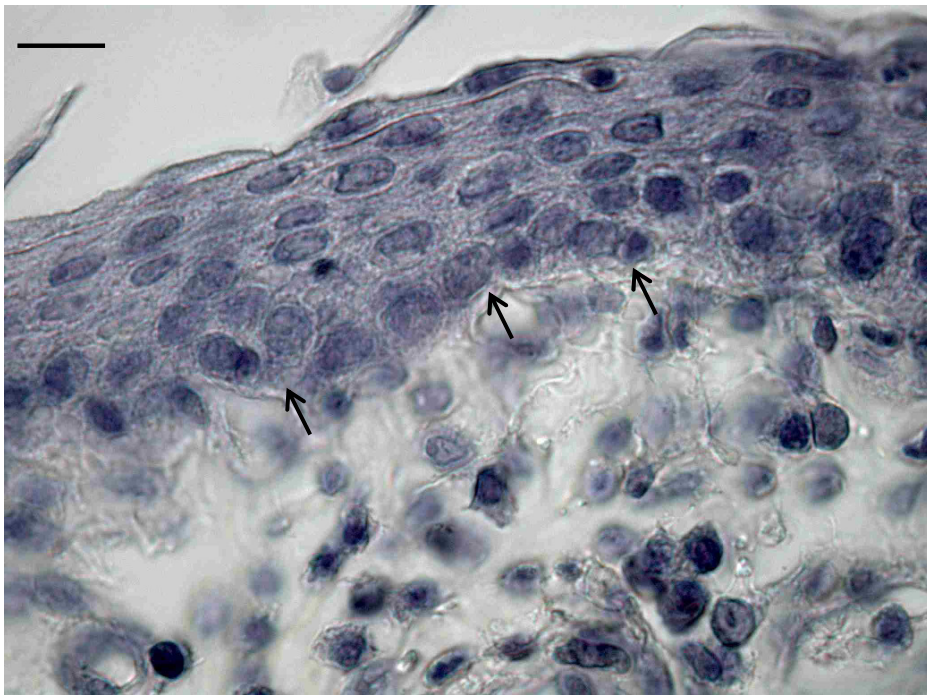


Abbildung 4.4.7 Darstellung des vaginalen Oberflächenepithels eines hochgraviden Schafes. Die Pfeile weisen auf isoprismatische Zellen des *Stratum basale* mit ihrem verhältnismäßig großen Zellkern. HE, 1000-fache Vergrößerung, Balkenlänge 10 µm.

Wie innerhalb des *Stratum superficiale* ergeben sich in der Morphologie der basalen Schicht des Vaginalepithels keine Unterschiede zwischen den Probandenkollektiven. Das *Stratum basale* besteht aus einer Lage isoprismatischer Zellen mit relativ großem Nukleus und gleichmäßig angefärbtem Zytoplasma (Abbildung 4.4.7).

Ein differierendes Merkmal zwischen den drei Gruppen läßt die Architektur des *Stratum intermedium* sowohl hinsichtlich der Anzahl der Zellschichten als auch der Gestalt der Epithelzellen erkennen, wodurch sich die festgestellten Höhenunterschiede des Epithelverbandes erklären lassen.

Morphologisch kann in den Gewebeschnitten der Schafe mit *Prolapsus vaginae ante partum* eine stark polygonale Gestalt der Epithelzellen beobachtet werden, die dem gesamten Zellverband ein squamöses Aussehen verleiht. Das Zytoplasma weist im Vergleich zu dem der beiden anderen Gruppen zum Teil eine ungleichmäßigere Anfärbung auf (Abbildung 4.4.8).

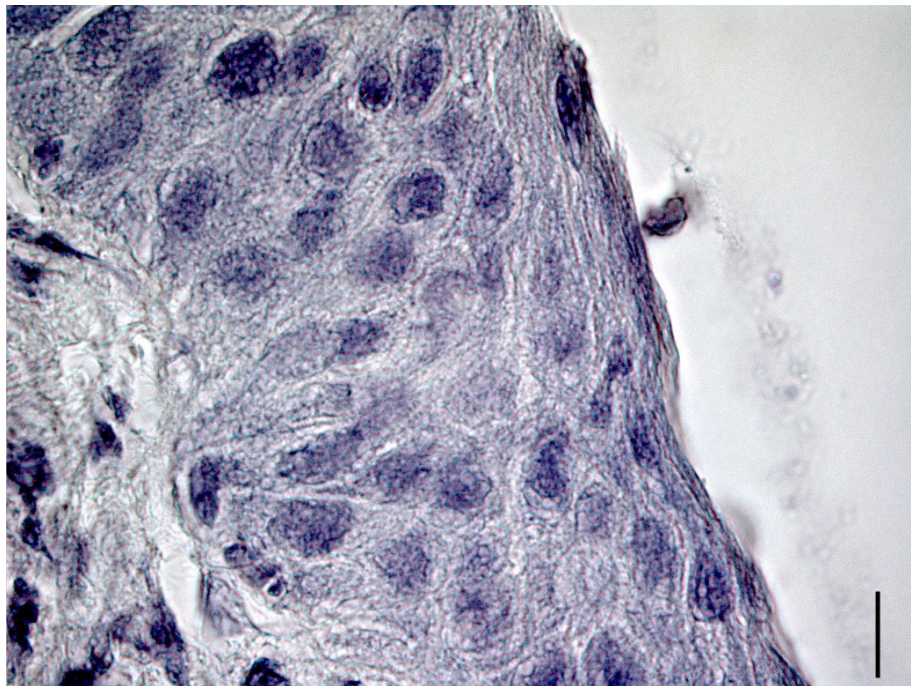


Abbildung 4.4.8 Darstellung des oberflächlichen Vaginalepithels in der Vaginalwand eines Schafes mit *Prolapsus vaginae ante partum*. Die Färbung der Zellen des *Stratum intermedium* stellt sich ungleichmäßiger dar als in den Gruppen 1 und 2. HE, 1000-fache Vergrößerung, Balkenlänge 10 µm.



## 5. DISKUSSION

Ogleich der *Prolapsus vaginae ante partum* aufgrund der Erkrankungshäufigkeit weltweit eine bedeutende Rolle für das Herdenmanagement und die Ökonomie in der Schafhaltung spielt, konnte eine zufriedenstellende ätiologische Erklärung der Erkrankung trotz zahlreicher Untersuchungen bislang nicht gegeben werden.

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, unter Berücksichtigung der endokrinologischen Situation und der Elektrolythomöostase weitere Erklärungsansätze dieses Krankheitsbildes beim Schaf zu erhalten. Hierzu wurde die Hypothese überprüft, ob Aberrationen in der Genexpression verschiedener Proteine und Enzyme des kollagenen Bindegewebsmetabolismus vorliegen. Des weiteren sollte die Möglichkeit einer erhöhten lokalen Östrogenwirkung durch die Betrachtung der Genexpression des Östrogenrezeptors  $\alpha$  untersucht werden. Zusätzlich wurde die Vaginalwand von Schafen i.p. und hochgraviden Tiere mit und ohne Vaginalprolaps histologisch charakterisiert und verglichen.

### 5.1. Diskussion der Methode

In der vorliegenden Studie wird das seit langer Zeit bekannte Krankheitsbild des *Prolapsus vaginae* a.p. beim Schaf erstmalig unter molekularbiologischen und lichtmikroskopischen Gesichtspunkten untersucht. Parallel dazu erfolgte eine Analyse der Elektrolytkonzentrationen für Kalzium, anorganisches Phosphat, Magnesium und Natrium sowie der Steroidhormone Progesteron und Östradiol-17 $\beta$  im peripheren Blut, um die Ergebnisse früherer Arbeiten zu überprüfen (EDGAR, 1952; STUBBINGS, 1971; SOBIRAJ et al., 1986; HOFMANN, 1998). Diese Vorgehensweise wurde gewählt, um die Vorstellungen zur Ätiologie der Erkrankung zu erweitern und gleichzeitig eine Einordnung der eigenen Ergebnisse hinsichtlich der bekannten Information zu diesem Krankheitsbild zu ermöglichen. Insgesamt konnten die Erkenntnisse anderer Autoren bezüglich des peripheren Steriodhormon- und Elektrolytstatus bestätigt werden, so daß die histologische und

molekularbiologische Auswertung der neuen Daten eine Erweiterung der bekannten Vorstellungen widerspiegelt und das untersuchte Kollektiv als repräsentativ betrachtet werden kann.

Bei der Auswahl der hochtragenden, gesunden Schafe und den Probanden mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. wurden nur solche Tiere berücksichtigt, bei denen das Intervall zwischen Probenentnahme und Geburt keine statistisch signifikanten Unterschiede aufwies, da innerhalb der letzten Wochen der Gravidität zur Vorbereitung des Partus Umbauvorgänge im vaginalen und zervikalen Gewebe stattfinden (FOSANG et al., 1984; MANABE und YOSHIDA, 1986; WU et al., 1995; LEUNG et al., 1999; REGASSA und NOAKES, 2001). Aufgrund dieser zeitlichen Übereinstimmung können die Ergebnisse als vergleichbar und repräsentativ gelten. Durch die Betrachtung der Verhältnisse i.p. unmittelbar nach der Expulsion des letzten Lammes sollte im Vergleich mit Schafen, die von einem Vaginalprolaps betroffen waren, die Hypothese überprüft werden, ob Mechanismen, welche *intra partum* wirksam sind, bei erkrankten Tieren vorzeitig ablaufen.

Für die Beurteilung der Ergebnisse mußten zum Zeitpunkt der Probenentnahme außer der Einflußgröße der Gestationsdauer sekundäre Schädigungen des Gewebes durch eine mechanische Traumatisierung des Gewebes oder bestehende Entzündungsvorgänge innerhalb der Schleimhaut als Störfaktoren beachtet werden. Diese Forderung ergibt sich deshalb, da inflammatorische Prozesse die Integrität der mRNA negativ beeinflussen und somit eine Reduktion der Aussagekraft der Expressionsvergleiche möglich ist. Daher war es notwendig, vor der Biopsie eine klinische Untersuchung aller Probanden durchzuführen und nur frisch erkrankte Schafe in die Studie aufzunehmen. Da geringgradige Entzündungsvorgänge jedoch nur ungenügend makroskopisch erfaßbar sind, erfolgte zusätzlich histologisch eine Kontrolle der Biopate auf das Vorliegen einer unphysiologisch übermäßigen Infiltration mit Entzündungszellen innerhalb des subepithelialen Gewebes. Diese Ergänzung der klinischen Befunde ermöglichte eine Auswahl möglichst optimaler Gewebeproben, so daß die Aussagekraft der Untersuchung zur Expression der mRNA wenigen Störfaktoren ausgesetzt ist. Als Nachteil ergab sich aus dieser sorgfältigen Prüfung des Gewebes, daß für die molekularbiologischen Studien nur wenig Material zur Verfügung stand. Zusätzlich mußte darauf geachtet werden, daß bei der Entnahme der Gewebeproben keine komplette Perforation der Vaginalwand



verursacht wurde, um Komplikationen in Form einer Peritonitis oder einer Infektion des lockeren Bindegewebes der *Adventitia* (Beckenphlegmone) vorzubeugen. Aus diesem Grund fehlen in den histologischen Präparaten die longitudinale Schicht der *Tunica muscularis* sowie die *Adventitia*. Für die Umbauvorgänge zum Ende der Gravidität sind diese Schichten der Vaginalwand jedoch nur von geringerem Interesse wie Untersuchungen an humanem Vaginalgewebe vermuten lassen (MANABE und YOSHIDA, 1986).

Aufgrund der stark begrenzten Menge des Probenmaterials mußte für die Isolation der RNA aus dem Gewebe die Methode mit der höchsten Effizienz ermittelt werden. Der Vergleich eines Systems mit einer Kieselgel-Säule, an die sich die RNA anlagert und anschließend eluiert wird, erwies sich gegenüber der etwas aufwendigeren Methode über eine Extraktion mit Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol als unterlegen. Ursache hierfür könnte der hohe Gehalt des vaginalen Gewebes an Proteoglykan-haltigen Verbindungen sein, der sich negativ auf die Anlagerung der RNA an die Säule auswirkt. In anderen Untersuchungen, bei denen eine Isolation von RNA aus expandierten Kumulus-Oozyten-Komplexen erfolgte, einem Material mit gleichermaßen vielen Proteoglykanen, erwiesen sich diese Moleküle als störend für eine Extraktion von RNA über ein Säulensystem (WEHREND, 1997).

Für die semiquantitative Analyse der mRNA-Expressionsraten wurde eine Methode gewählt, die mit Hilfe einer Messung der optischen Dichte der Amplifikatbanden nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarosegel Schätzungen der Ausgangsmenge an spezifischer mRNA ermöglicht (MARONE et al., 2001).

Ein unterschiedliches Niveau der Amplifikatmenge ist aufgrund der exponentiellen Vervielfältigung des Templates positiv mit der ursprünglichen mRNA-Expressionsrate korreliert. Da es sich bei dem vorliegenden Probenmaterial jedoch um heterogen zusammengesetztes Gewebe handelt, ist ein direkter Rückschluß von den Ergebnissen des optischen Tests auf die Unterschiede in der Expressionsrate spezifischer Produkte nicht zulässig. Dies erklärt sich vor allem aus der Tatsache, daß einerseits die Verteilung der Zellen innerhalb von Gewebeproben variiert. Andererseits ist auch der Anteil an mRNA innerhalb der heterogenen Mischung der Gesamt-RNA nicht als konstant anzusehen (SAMBROOK, 1989).

Unter Berücksichtigung dieser Umstände entwickelten NASH et al. (1998) eine Modifikation der quantitativen PCR, bei der die Ergebnisse spezifischer Amplifikate über eine Standardkurve in Relation zu der Expression eines sogenannten „*House Keeping Genes*“, der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, ausgewertet werden. Diese Methode fand in der vorliegenden Arbeit Anwendung.

Aufgrund der Empfindlichkeit der semiquantitativen PCR-Methode bestand die Notwendigkeit, simultane PCR-Durchgänge aller zu vergleichenden Proben durchzuführen (NASH et al., 1998). Da jedoch nicht von jedem Tier zur gleichen Zeit genügend Material zur Verfügung stand, um alle Proben miteinander zu vergleichen, wurden folgende Gruppenvergleiche durchgeführt: Hochgravide Schafe mit Tieren, die an einem *Prolapsus vaginae* a.p. litten, sowie Proben von Schafen i.p., unmittelbar nach Expulsion des letzten Lammes, mit solchen von Tieren mit einem antepartalen Vaginalprolaps. Zur statistischen Absicherung erfolgte eine zweimalige Durchführung aller PCR-Reaktionen unter Mitführung einer Positiv- und Negativkontrolle. Zur Überprüfung der Basenabfolge der amplifizierten Fragmente wurden diejenigen cDNA-Templates exemplarisch für die Sequenzierung ausgewählt, bei deren Expression signifikante Unterschiede nachweisbar waren.

## 5.2. Diskussion der klinischen Befunde

Die Auswertung der klinischen Befunde bei der Behandlung der Tiere erbrachte keine Hinweise auf die Ursache und Entstehung des Vaginalprolaps. Nur bei einem Schaf lagen bei Einlieferung Anzeichen einer milden Gestationsketose vor, die jedoch im Verlauf der weiteren Gravidität nicht mehr nachweisbar waren.

Die in der Literatur als ein prädisponierender Faktor in der Entstehung eines antepartalen Vaginalprolaps genannte gehäufte Zahl von Mehrlingsgraviditäten konnte in der aktuellen Studie nicht bestätigt werden (EDGAR, 1952; McLEAN, 1956; RÜSCH und BERCHTOLD, 1978). Die mittlere Anzahl geborener Lämmer pro Muttertier variierte in den Gruppen nur gering und zeigte statistisch keinen signifikanten Unterschied. Auch der Vergleich mit der Spezies Ziege, bei der

Zwillings- und nicht selten auch Drillingsgraviditäten vorkommen, mindert die ätiologische Bedeutung der Mehrlingsträchtigkeit für den ovinen *Prolapsus vaginae ante partum*. Selbst wenn die gegen Ende der Gravidität im Vergleich zu uniparen Tieren beengteren abdominalen Verhältnisse eine stärkere Irritation des Mutterschafes hervorrufen, die in einem vermehrten Pressen und Drängen Ausdruck findet, müssen dennoch weitere Faktoren hinzutreten, damit es zur Ausbildung eines antepartalen Vaginalprolaps kommen kann. Bei bestehendem habituellem Vaginalprolaps kann der vergrößerte abdominale Druck bei zwillingsgraviden Schafen jedoch möglicherweise eher zu einem stationären Vorfall des Vaginalgewebes führen als bei einer Einlingsträchtigkeit. Somit ist dieser Faktor mehr für die Unterhaltung als für die Entstehung der Erkrankung von Bedeutung.

Trotz der relativ geringen Probandenzahl von sechs Tieren und einer rechtzeitigen Behandlung des *Prolapsus vaginae* a.p. in Form einer Reposition und Anlegen eines Scheidenverschlusses nach BÜHNER war in dieser Gruppe eine deutlich erhöhte Dystokierate im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar. Auffällig zeigte sich zudem, daß sich die Ursache der Geburtsstörung in allen Fällen auf eine mangelhafte Öffnung der Zervix zurückführen ließ. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate früherer Untersuchungen, die die Ursachen einer Dystokie bei Tieren nach ungestörter Gravidität und nach einem *Prolapsus vaginae* a.p. verglichen (SOBIRAJ, 1990; SOBIRAJ, 1994; KLOSS et al., 2002). In beiden Studien war der Anteil maternal bedingter Geburtstörungen infolge Zervixmanschette in der Gruppe der antepartal erkrankten Schafe erkennbar, jedoch statistisch nicht signifikant, erhöht. Eine retrospektive Untersuchung an einer größeren Tierzahl zeigte zudem, daß eine Dystokie aufgrund mangelhafter Öffnung der Zervix beim Schaf im Vergleich zu anderen Spezies die quantitativ wichtigste Dystokieursache darstellt (WEHREND und BOSTEDT, 2004).

Auf die Frage, inwiefern die Öffnungsvorgänge der Zervix durch einen präpartalen Vaginalprolaps negativ beeinflußt werden, sind verschiedene Hypothesen denkbar: 1. Es könnte eine Störung des zervikalen *Softenings* durch inflammatorische Prozesse im prolabierten vaginalen Gewebe ausgelöst werden.

Aufgrund der klinischen Befunde bei Einlieferung sowie der fehlenden Anzeichen einer Entzündung bei der Auswertung der histologischen Präparate kann diese Annahme nahezu ausgeschlossen werden. Zudem wurde den betroffenen Schafen

über mehrere Tage parenteral Antibiotika verabreicht, um ascendierende Infektionen zu verhindern. Auch konnte während des Partus im Rahmen der geburtshilflichen Untersuchung bei den Patientinnen keine Vaginitis diagnostiziert werden.

2. Bei Schafen mit einem antepartalen Vaginalprolaps liegen nicht nur Störungen innerhalb des vaginalen Bindegewebsstoffwechsels vor.

Da auch bei der Zervixreifung dynamische Umbauprozesse des Gewebes zu einer Veränderung der mechanischen Eigenschaften der *Cervix uteri* führen (FOSANG et al., 1984; OSMERS et al., 1992; OWINY et al., 1995), wäre eine gleichzeitige, negative Beeinflussung des präpartalen zervikalen *Softenings* möglich, welche sich jedoch antepartal klinisch nicht manifestiert.

3. Des weiteren könnten die bei erkrankten Schafen beobachteten knapp statistisch nicht signifikant höheren Progesteronwerte, die eine Bestätigung früherer Ergebnisse darstellen (SOBIRAJ et al., 1986; HOFMANN, 1998), eine partielle Blockierung der physiologischen zervikalen Reifungsvorgänge bewirken.

Ein inhibitorischer Effekt des Progesterons auf die Synthese kollagenolytischer Enzyme wurde von SATO und Mitarbeitern (1991) in Zellkulturen zervikaler Fibroblasten von graviden Ratten nachgewiesen.

### 5.3. Diskussion der Ergebnisse der Blutuntersuchungen

#### *Plasmaelektrolytkonzentrationen*

Bezüglich des Gesamt-Kalziums konnten in der vorliegenden Untersuchung bei den hochgraviden, gesunden Schafen die höchsten mittleren Plasmaspiegel gemessen werden, gefolgt von Tieren i.p.. Die geringsten Konzentrationen wurden bei Schafen mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. ermittelt. Diese Ergebnisse lassen zwar auf einen tendenziell niedrigeren Kalziumspiegel bei den erkrankten Tieren gegenüber den gesunden Probanden schließen, eine statistische Signifikanz war jedoch nicht gegeben. Bemerkenswert war, daß die in der Literatur für den peripartalen Zeitraum angegebene untere Normwertgrenze von 2,2 mmol/l (BOSTEDT und HAUSMANN, 1980) von allen Probanden mit einem antepartalen Vaginalprolaps unterschritten

wurde. Aufgrund des Fehlens klinischer Symptome muß daher davon ausgegangen werden, daß bei erkrankten Tieren eine subklinische Hypokalzämie vorlag.

Diese Ergebnisse bestätigen weitgehend die Beobachtungen früherer Studien. Bereits STUBBINGS (1971) fand bei Schafen in der Hochgravidität und während der Geburt keine Unterschiede, dagegen wiesen Tiere mit einem Vaginalprolaps a.p. statistisch signifikant erniedrigte Kalziumwerte gegenüber Schafen gleichen Gestationsstadiums auf. Antepartal konnten SOBIRAJ und Mitarbeiter (1986) statistisch signifikante Unterschiede zwischen gesunden Tieren und Probanden mit Vaginalprolaps feststellen, wobei die erkrankten Schafe erniedrigte Plasmawerte zeigten. In einer weiteren Untersuchung an hochgraviden Muttertieren und Schafen mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. wurden jedoch keine Unterschiede der Konzentration des Gesamt-Kalziums ermittelt (HOFMANN, 1998). Auch lagen die mittleren Kalziumwerte der erkrankten Tiere höher als in den zuvor genannten Studien (2,4 mmol/l). Keine eindeutigen Verhältnisse hinsichtlich des Kalziumspiegels konnten auch HOSIE et al. (1991) in ihrer Arbeit belegen. So zeigte nur ein Teil der betroffenen Schafe eine subklinische Hypokalzämie, während die überwiegende Zahl der Tiere Werte innerhalb des Referenzbereiches aufwiesen.

Diese Beobachtungen stützen die These, daß eine subklinische Hypokalzämie bei der Entstehung des antepartalen Vaginalprolaps beim Schaf eine prädisponierende Rolle zu spielen scheint, diese jedoch nicht überbewertet werden darf. Ätiologisch liegt der Ansatzpunkt in der Beteiligung von Kalziumionen an der Kontraktilität und Tonuserhaltung glatter und quergestreifter Muskulatur. Ein manifester Kalziummangel würde die Stabilität der Vaginalwand negativ beeinflussen und könnte somit eine Verlagerung des Scheidengewebes begünstigen.

Andererseits wäre es möglich, daß der anhaltende, unphysiologisch starke Preßreiz, der in der Regel bei Schafen mit Vaginalprolaps zu beobachten ist, eine Umverteilung des Kalziums aus der extrazellulären Flüssigkeit in die kontraktile Zellen bedingt. Die nachgewiesene Hypokalzämie könnte demnach auch als Folge und nicht als Ursache des *Prolapsus vaginae* zu werten sein. Diese Meinung vertreten HOSIE und Mitarbeiter (1991).

Es ist jedoch auffällig, daß bei erkrankten Schafen auch nach der Behandlung des *Prolapsus vaginae* im Verlauf der Gravidität weiterhin statistisch signifikant geringere Kalziumspiegel im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren fortbestehen (SOBIRAJ et al., 1986). Diese Tatsache könnte einen Erklärungsansatz bilden, warum nach einem

*Prolapsus vaginae* a.p. vermehrt maternal bedingte Geburtsstörungen in Form einer unzureichend dilatierten Zervix auftreten (RÜSCH und BERCHTOLD, 1978; SOBIRAJ, 1990; KLOSS et al., 2002). Auch STUBBINGS (1971) wies im Zusammenhang mit Öffnungsstörungen der ovinen Zervix erniedrigte Kalziumwerte bei betroffenen Tieren nach. Durch den erniedrigten peripheren Kalziumgehalt könnte eine Wehenschwäche entstehen, die eine verminderte passive Weitung der Zervix nach sich zieht. Da die Öffnung der Zervix zu einem großen Teil auf die dilatatorische Wirkung des Druckes von Fruchthüllen und Fetus durch die Wehen begründet ist, kommt es in diesen Fällen zu einer Zervixmanschette.

Der Vergleich des anorganischen Phosphats spiegelte ähnliche Tendenzen zwischen den Probandengruppen wider, wie sie bei den Kalziumkonzentrationen zu beobachten waren. Erkrankte Schafe wiesen durchschnittlich niedrigere Werte auf als die nicht betroffenen Tiere. Die Differenzen zwischen den Gruppen erwiesen sich jedoch als statistisch nicht signifikant. Des weiteren wurden die in der Literatur angegebenen unteren Normwertbereiche nicht unterschritten (BOSTEDT und HAUSMANN, 1980; BICKHARDT und KÖNIG, 1985).

Hinsichtlich der Magnesium- und Natriumkonzentrationen bestanden im Gruppenvergleich keine auffälligen Unterschiede.

Somit konnten die Ergebnisse früherer Autoren für die Elektrolyte Kalzium, anorganisches Phosphat und Natrium durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden (STUBBINGS, 1971; SOBIRAJ et al., 1986; HOFMANN, 1998). Ein Widerspruch bezüglich der Magnesiumkonzentration besteht zu HOFMANN (1998), der bei Schafen mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. signifikant erniedrigte Blutspiegel nachwies. Er führte diese auf einen erhöhten Verbrauch durch eine verstärkte neuromuskuläre Erregungsübertragung im Rahmen der aktivierten Bauchpresse zurück.

#### *Hormonkonzentrationen*

Die Progesteronkonzentrationen wiesen eine hohe Streuung der Einzelwerte auf. Wie erwartet war der mittlere Hormonspiegel der Tiere i.p. am niedrigsten, lag jedoch wegen des weitgehend plazentären Ursprungs des Progesterons

physiologischerweise deutlich über dem von Rindern zum Zeitpunkt der Geburt (KLAUKE und HOFFMANN, 1992). Bei Schafen mit einem Vaginalprolaps wurde der höchste Mittelwert erreicht. In dieser Gruppe bestand jedoch auch die größte Spannweite zwischen der minimalsten und maximalsten gemessenen Progesteronkonzentration. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen anderer Autoren überein, die zwar gleichfalls tendenziell, nicht aber statistisch abzusichernde, höhere Progesteronkonzentrationen bei erkrankten Tieren nachgewiesen haben (SOBIRAJ et al., 1986; HOFMANN, 1998). Auf die mögliche Bedeutung erhöhter Progesteronspiegel für das Krankheitsbild des *Prolapsus vaginae* a.p. wurde bereits weiter oben eingegangen.

Auch die Überprüfung des Plasmaspiegels des Östradiol-17 $\beta$  ergab Werte, die dem physiologischen, endokrinologischen Status von Tieren während der Gravidität und in der Geburt entsprechen (ROBERTSON und SMEATON, 1973). Es zeigte sich keine statistisch zu sichernde Differenz zwischen gesunden und erkrankten Schafen. Die im Vergleich zu graviden Probanden gleichen Gestationsstadiums tendenziell erhöhten Konzentrationen bei Tieren mit einem antepartalen Scheidenvorfall stimmen mit den Beobachtungen von SOBIRAJ et al. (1986) und HOFMANN (1998) überein.

Auffällig war die starke individuelle Streuung innerhalb der Gruppe der intrapartalen Tiere, bei denen die höchsten Meßwerte ermittelt wurden. Dies entspricht den Angaben anderer Autoren, die *intra partum* einen Peak des Östradiol-17 $\beta$  mit Werten bis über 1835 pmol/l beobachteten (ROBERTSON und SMEATON, 1973; SOBIRAJ et al., 1986; HOFMANN, 1998), was auf die gesteigerte Produktion von Östradiol-17 $\beta$  um den Geburtszeitpunkt zurückgeführt wird.

Die in der älteren Literatur (EDGAR, 1952; McLEAN, 1956) angenommene Hypothese eines peripher erfaßbaren Hyperöstrogenismus als ätiologischer Faktor des ovinen *Prolapsus vaginae* a.p. kann durch die vorliegenden Ergebnisse in Übereinstimmung mit SOBIRAJ et al. (1986) und HOFMANN (1998) nicht bestätigt werden, wohl aber eine tendenzielle Imbalance innerhalb des Steroidhormonhaushaltes.

#### 5.4. Diskussion der molekularbiologischen Ergebnisse

Die Ergebnisse der Expressionsstudien weisen auf Störungen im antepartalen Stoffwechsel des kollagenen Bindegewebes der Vaginalwand bei Schafen mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. hin. Während die zur Überprüfung einer lokal verstärkten Östrogenwirkung untersuchte Expression des Östrogenrezeptor  $\alpha$  keine Hinweise auf einen hyperöstrogenen Effekt im prolabierten Vaginalgewebe lieferte.

##### *Kollagen I*

Die mRNA-Expression der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I von Schafen mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. unterscheidet sich statistisch signifikant von der hochgravider Kontrolltiere, wobei die erkrankten Probanden ein geringeres mittleres Expressionsniveau aufweisen. Zu Tieren i.p. bestehen keine statistisch gesicherten Differenzen. Der geometrische Mittelwert betroffener Schafe liegt auch hier unter dem gesunder Probanden. Die Sequenzierung des PCR-Produktes und der anschließende Vergleich mit den Sequenzen anderer Spezies bestätigten aufgrund hoher Homologie, daß ein Abschnitt der  $\alpha_2$ -Kette des (Pro-)Kollagen I amplifiziert wurde.

Dieses Ergebnis ist neu und weist darauf hin, daß eine veränderte Expression der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I in der Ätiologie der Erkrankung eine Rolle zu spielen scheint. Ob das verminderte Expressionsniveau mit einer geringeren Rate der Proteinbiosynthese der  $\alpha_2$ -Kollagenkette und somit mit einem niedrigeren Kollagengehalt der Vaginalwand einhergeht, kann durch die vorliegenden Daten nicht beantwortet werden. Da vor der Zusammenlagerung der Polypeptide zu einer Tripelhelix eine posttranslationale Modifikation der einzelnen Kollagenketten einer Fibrille notwendig ist (OLSEN und NINOMIYA, 1999) könnte eine Regulation nicht nur auf Ebene der Transkription erfolgen, sondern auch in nachgeschalteten Schritten der Kollagensynthese.

In einer humanmedizinischen Studie konnten JACKSON und Mitarbeiter (1996) bei Patientinnen mit einem prämenopausalen Scheidenvorfall einen gegenüber der Kontrollgruppe reduzierten Kollagengehalt der Vaginalwand biochemisch



nachweisen, allerdings ohne eine parallele Prüfung der mRNA-Expression durchzuführen. Des weiteren waren intermolekulare Vernetzungen der Kollagenfasern vermindert, was auf eine Neubildung von Kollagen und einen Ersatz des Gewebes hinwies, aber aufgrund fehlender Querverbindungen der juvenilen Fasern zu einer geringeren Stabilität der Vaginalwand führte.

Eine physiologisch verminderte mRNA-Expression des Kollagen I findet in der humanen Zervix unmittelbar nach der Geburt des Säuglings statt, die mit einer signifikanten Reduktion des Kollagengehaltes des zervikalen Bindegewebes korreliert (WESTERGREN-THORSSON et al., 1998). Der Rückgang der Kollagenexpression ist jedoch eng mit dem Einsetzen der Geburt gekoppelt, da die Autoren in den letzten Tagen der Schwangerschaft nur graduelle Veränderungen des mRNA-Niveaus beobachten konnten. Die ovine Zervix weist ebenfalls eine Reduktion des Kollagengehalts auf, die sich besonders über die letzten Wochen der Gravidität erstreckt und ihr Maximum während des Partus erreicht (FOSANG et al., 1984).

Die morphologischen und biochemischen Veränderungen der vaginalen Wandstrukturen in der letzten Phase der Gravidität und zum Zeitpunkt der Geburt sind bislang kaum erforscht. Daher ist eine generelle Übertragung der Erkenntnisse über das zervikale *Softening* auf die peripartalen Reifungsvorgänge im Vaginalgewebe ohne weitere Studien nur unter Vorbehalt möglich. Eine humanmedizinische Studie über die morphologischen Veränderungen des vaginalen Bindegewebes in der Schwangerschaft und während des Partus unterstützt dieses These, da zwar starke Ähnlichkeiten zu den Umgestaltungen des zervikalen Gewebes bestanden, im Detail dennoch nicht unwesentliche Differenzen nachgewiesen werden konnten (MANABE und YOSHIDA, 1986). So fehlte im vaginalen Gewebe eine Infiltration mit Neutrophilen Granulozyten, die in der Zervix für den Prozeß des *Softenings* von großer Bedeutung sind. Die Ödematisierung des subepithelialen Bindegewebes ist in der Zervix deutlicher ausgeprägt, was die Autoren auf die initial dichtere Anordnung der Kollagenfasern in der Zervix zurückführen.

### *MMP1 und TIMP 1*

Als Indikator für katabole Stoffwechselprozesse innerhalb des kollagenen Bindegewebes wurde die Expressionsrate einer Kollagenase gewählt, da dieses Enzym intakte Kollagenfasern angreift und degradiert (BOSMANN und STAMENKOVIC, 2003; VISSE und NAGASE, 2003). Basierend auf den Studien von MANABE und YOSHIDA (1986), die in humanem Vaginalgewebe zum Zeitpunkt der Geburt keine verstärkte Infiltration des Gewebes mit Leukozyten nachweisen konnten und daher den Ursprung der Enzyme in den Fibroblasten vermuteten, sowie den eigenen histologischen Befunden, die keine stärkere Ansammlung von Leukozyten in prolapiertem Gewebe ergaben, wurde unter den Kollagenasen die MMP 1 ausgewählt, da diese vornehmlich von Fibroblasten gebildet wird.

Die vorliegenden Resultate der mRNA-Expression der MMP 1 spiegeln nur Tendenzen wider und liefern keine statistisch gesicherten Erkenntnisse. Die mittlere Expressionsrate lag bei Schafen mit einem antepartalen Vaginalprolaps höher als bei graviden Kontrolltieren. Die Unterschiede zwischen erkrankten Tieren und Probanden i.p. fielen geringer aus und wiesen darauf hin, daß das Expressionsniveau der Gruppe mit Prolaps tendenziell niedriger als bei den gesunden Schafen i.p. war.

Bezogen auf die Ätiologie des ovinen *Prolapsus vaginae* a.p. verstärken die Resultate der Expressionsstudie der MMP 1 die Vermutung einer Störung im antepartalen Metabolismus des kollagenen Bindegewebes der Vagina. Dies wird durch frühere Untersuchungen aus der Humanmedizin unterstützt, in der die Autoren bei Patientinnen mit einem prämenopausalen Vaginalprolaps eine verstärkte MMP-Aktivität bei erniedrigtem Kollagengehalt der Vaginalwand feststellen konnten (JACKSON et al., 1996).

Die Beteiligung von Kollagenasen am physiologischen Prozeß des zervikalen *Softening* beim Schaf ist seit längerem bekannt, wobei ein drastischer Anstieg der Enzymaktivität erst i.p. erfolgte (ELLWOOD et al., 1981). Als Syntheseort wurden die beim Schaf zum Geburtszeitpunkt in der *Lamina propria vaginae* vermehrt auftretenden Neutrophilen Granulozyten identifiziert (OWINY et al., 1995; LUQUE et al., 1997). Wegen der fehlenden Unterschiede zum graviden Gewebe ist für die Vagina anzunehmen, daß wie bei der Spezies Mensch die Kollagenasen von Fibroblasten synthetisiert und sezerniert werden (MANABE und YOSHIDA, 1986).

Die Expressionsstudie des TIMP 1, einem physiologischen Inhibitor der MMP 1, erbrachte keine statistisch gesicherten Unterschiede zwischen den Gruppen. Tendenziell lag die Expressionsrate bei Schafen mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. auf einem niedrigeren mittleren Niveau als bei der hochgraviden Kontrollgruppe. Möglicherweise ergibt sich daraus ein verändertes Verhältnis von Enzym und Inhibitor, was zu einer gesteigerten Aktivität der Kollagenase führen könnte, ohne daß eine Erhöhung der absoluten Enzymmenge notwendig wäre.

Wie bei der Synthese der Kollagenfasern aus den einzelnen (Pro)Kollagenketten nach der Transkription weitere Modifikationen der Polypeptide erfolgen, unterliegen auch Enzyme und deren Inhibitoren verschiedenen Konformationsänderungen. Kollagenasen werden zum Schutz des Gewebes vor unkontrolliertem Abbau in einer inaktiven Zymogenform sezerniert und erst an ihrem Bestimmungsort aktiviert (CURRY und OSTEEN, 2001). Die Wirkung von inhibitorischen Substanzen kann je nach Konzentration zum Enzym unter Umständen hemmende oder aktivierende Wirkung haben (CLARK et al., 1994). Daher sind die Aussagen auf die Effekte der Endprodukte anhand ihrer mRNA-Expressionsraten nur als hinweisend für Störungen des Metabolismus zu bewerten und erlauben keine direkten Rückschlüsse auf Enzymmengen oder -aktivitäten und müssen durch weitergehende Untersuchungen genauer charakterisiert werden.

Insgesamt konnten in der vorliegenden Untersuchung Aberrationen innerhalb des kollagenen Bindegewebsstoffwechsels der Vagina zwischen hochtragenden Kontrolltieren und erkrankten Schafen festgestellt werden. Hingegen zeigten die untersuchten Parameter des Kollagenmetabolismus von Tieren mit Vaginalprolaps nur geringfügige Differenzen zu gesunden Probanden *intra partum*.

Wegen der methodischen Beschränkungen war ein direkter Vergleich der Expressionsraten von gesunden graviden Schafen und Probanden i.p. nicht möglich. Daher kann die Hypothese nicht eindeutig geklärt werden, ob bei Tieren mit einem antepartalen Vaginalprolaps die selben Mechanismen wirken, die physiologisch erst i.p. einsetzen und zu einer Reifung und Erweichung des Vaginalgewebes führen. Trotzdem darf aufgrund der Ergebnisse vermutet werden, daß die beobachteten Veränderungen innerhalb des Kollagenstoffwechsels bei antepartal erkrankten

Schafen als vorzeitig ablaufende intrapartale Reifungsvorgänge des Vaginalgewebes angesehen werden können.

### *Östrogenrezeptor $\alpha$*

Um Hinweise auf eine mögliche lokal verstärkte Östrogenwirkung innerhalb des prolabierte Vaginalgewebes zu erhalten, wurde die Expressionsrate des Östrogenrezeptors  $\alpha$  untersucht. Die Sequenzierung erbrachte die Sicherheit, daß es sich bei dem amplifizierten Fragment um einen Bereich des ovinen Östrogenrezeptor  $\alpha$  handelte.

Das mittlere Expressionsniveau erkrankter Schafe lag im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen niedriger. Zwischen hochgraviden, gesunden Tieren und Probanden mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. stellte sich dieser Unterschied als statistisch signifikant dar ( $p < 0,01$ ). Diese Ergebnisse überraschten zum Teil. WU und Mitarbeiter (1995) zeigten in ihrer Studie, daß sich die Expression des Östrogenrezeptors  $\alpha$  in Uterus und Zervix des Schafes im letzten Drittel der Trächtigkeit kaum verändert, bei Einsetzen der Geburt jedoch ein starker Anstieg des mRNA-Niveaus zu beobachten war. Da die Dauer der Trächtigkeit nach der Biopotentnahme in der eigenen Untersuchung statistisch keinen Gruppenunterschied zeigte, wurde bei beiden graviden Kollektiven aufgrund fehlender histologischer Hinweise einer verstärkten lokalen Östrogenwirkung, ein ähnlicher Level der Genexpression erwartet. Worauf sich der Gruppenunterschied begründet und welche Bedeutung dieser in Bezug auf die Pathogenese des ovinen *Prolapsus vaginae* a.p. hat bleibt unklar. Zwar wurden bei Patientinnen mit einem prämenopausalen Vorfall der Genitalorgane im Bindegewebe der uterinen Ligamente eine Verringerung der mRNA-Expression des Östrogenrezeptors  $\alpha$  nachgewiesen, allerdings zeigten diese Frauen auch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigte periphere Östrogenspiegel (LANG et al., 2003), was die Vergleichbarkeit mit den Resultaten der vorliegenden Studie in Frage stellt.

Eine aufgrund einer verstärkten Rezeptorexpression erhöhte lokale Östrogenwirkung bei Schafen mit einem antepartalen *Prolapsus vaginae* kann durch die aktuellen Ergebnisse zumindest auf Ebene der Transkription als nicht wahrscheinlich gelten. Bereits durch die Ergebnisse der peripheren Östradiol-17 $\beta$ -Konzentrationen wurde die Annahme eines generellen Hyperöstrogenismus widerlegt. Weiterführende

Studien, die sich mit dem Nachweis von Rezeptorprotein, der Bindungskinetik zwischen Hormon und Rezeptor oder den lokalen Östrogenspiegeln beschäftigen, wären notwendig, um andere Regulationsmechanismen der Hormonwirkung zu untersuchen.

### 5.5. Diskussion der histologischen Ergebnisse

In Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur konnte bei allen drei Gruppen der charakteristische dreischichtige Aufbau der Vaginalwand aus mehrschichtigem Plattenepithel, *Lamina propria mucosae* und *Tunica muscularis* identifiziert werden (LEISER, 1990; LIEBICH, 1999a). Die Morphologie der epithelialen Schicht wies die markantesten Unterschiede zwischen den Gruppen auf, die tieferen Zonen dagegen zeigten nur wenige gruppenspezifische Merkmale, soweit durch die Entnahmetechnik beurteilbar.

Von der *Tunica muscularis* war in allen Präparaten aufgrund der Entnahmetechnik nur die innerste, zirkulär verlaufende Schicht erhalten. Gruppenspezifische Besonderheiten waren nicht zu registrieren.

In der oberen Zone der *Lamina propria mucosae* aller Gewebeschnitte konnten gleichermaßen leukozytäre Infiltrationsherde nachgewiesen werden, die von LEISER (1990) als physiologischer Bestandteil der Vaginalwand beschrieben wurden und daher nicht als Zeichen inflammatorischer Prozesse gewertet werden dürfen. Auch die nur vereinzelt vorgefundenen mononukleären Zellen in tieferen Anteilen der *Lamina propria* entsprechen physiologischen Verhältnissen. Diese Zellen waren nicht gefäßassoziiert. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von MANABE und YOSHIDA (1986) an humanen Präparaten der Vaginalwand während der Schwangerschaft und der Geburt. Vergleichbare Studien über die peripartalen Veränderungen im Vaginalgewebe beim Schaf oder anderen Haussäugetieren liegen bislang nicht vor. Allerdings können in allen Zyklusstadien des Schafes verschiedene Typen freier Zellen in der *Lamina propria* identifiziert werden, die aus rundkernigen und polymorphkernigen Leukozyten bestanden (REY DE ZORZIN, 1988).

Aufgrund der mechanischen Beanspruchung des Vaginalgewebes bei der Expulsion der Lämmer erschienen bei Schafen i.p. in allen Präparaten subepitheliale Blutungen, die den übrigen Probandengruppen fehlten. Als ein weiteres Charakteristikum, das nur innerhalb des Kollektivs i.p. auftrat, war eine Migration der Leukozyten, hier vor allem der Neutrophilen Granulozyten, von der *Lamina propria* durch den Epithelzellverband hindurch auf die luminale Seite des *Epitheliums* zu vermuten.

Die Oberfläche des Epithels wies nach der Passage der Lämmer abschnittsweise Abrasionen der obersten Zellschicht auf, intakte Bezirke waren luminal von einer leukozytenhaltigen Schleimablagerung überzogen. Da der Vaginalschleimhaut des Schafes im Gegensatz zur Zervix Drüsen oder Becherzellen fehlen (LEISER, 1990; SMOLLICH, 1992; LIEBICH, 1999a), stellen die Ablagerungen wahrscheinlich Bestandteile des Fruchtwassers dar. Sie waren bei den tragenden Tieren mit und ohne Vaginalprolaps nicht zu detektieren.

Eine Ödematisierung des subepithelialen Bindegewebes, die in einem Auseinanderweichen der Kollagenfasern durch eine vermehrte extrazelluläre Einlagerung von Flüssigkeit und amorpher Grundsubstanz erkennbar ist, konnte in geringem Umfang bei Tieren i.p. beobachtet werden. Nach einem Partus *per via naturalis* trat auch in humanen Präparaten der Vaginalwand eine Zunahme der Ödematisierung auf, zudem wurde elektronenmikroskopisch eine Verminderung des Durchmessers und der regelmäßigen Ausrichtung der Kollagenfibrillen detektiert (MANABE und YOSHIDA, 1986). Eine Auflockerung und Ödematisierung der *Lamina propria* ist beim Schaf als Effekt des erhöhten Östrogenspiegels während des Östrus erkennbar (REY DE ZORZIN, 1988). Bei den Probanden mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. sowie den hochtragenden gesunden Tieren erschienen die Räume zwischen den Kollagenfasern nicht vergrößert. Es konnten in diesem Abschnitt der ovinen Vaginalwand demnach keine Hinweise für eine Ödematisierung des Gewebes vorgefunden werden, die für eine lokal verstärkte Östrogenwirkung bei antepartal erkrankten Schafen sprechen würde. Auf einen lichtmikroskopisch erfaßbaren Vergleich der Verteilung der Kollagenfasern und des Gesamtkollagengehaltes im Vaginalgewebe wurde verzichtet, da diese Methode im Gegensatz zu exakteren Hydroxyprolin-Messungen oder der Elektronenmikroskopie nur unzureichende Ergebnisse liefern würde, die die Aussagekraft der Resultate stark einschränken.

Bereits AYEN und NOAKES (1998) hinterfragten aus diesem Grund die in ihrer Arbeit erzielten Ergebnisse, wonach keine wesentlichen Differenzen zwischen Kollagengehalt und Verteilung der Fasern bei gesunden, graviden Tieren und Schafen nach einem Vaginalprolaps bestehen.

Die Höhe des *Epithelium vaginae* differierte zwischen den Gruppen statistisch hoch signifikant. Bei Schafen mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. bestand eine etwa 2 fach höhere mittlere Dicke der Epithelschicht als bei hochgraviden, gesunden Tieren und Schafen *intra partum*. Dies ergibt sich aus der Anzahl an Zellschichten des Epithels, das bei erkrankten Probanden statistisch hoch signifikant mehr Lagen aufwies als bei den Kontrolltieren. Bei allen Probanden, unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit, bestanden das luminale *Stratum superficiale* aus zwei Schichten und das *Stratum basale* aus einer Reihe von Zellen. Die Differenz in der Höhe und der Anzahl des Epithelverbandes war in der Architektur des *Stratum intermedium* begründet, welches bei Individuen mit einem antepartalen Vaginalprolaps am breitesten war. Die geringste Anzahl lag bei Tieren i.p. vor, gefolgt von den gesunden, hochgraviden Schafen. Die Zunahme der Epithelhöhe bei den erkrankten Probanden begründet sich mit der Vermehrung der Zellschichten und darf daher als Hyperplasie gedeutet werden.

Allgemein wird einer Hyperplasie des Vaginalepithels ein östrogenabhängiger Mechanismus unterstellt. Bekanntermaßen ist eine deutliche Proliferation des Vaginalepithels bei verschiedenen Tierarten während der Proöstrus- und Östrusphase des Zyklus zu beobachten. Beim Rind konnten WROBEL und Mitarbeiter (1986) einen Einfluß der Steroidhormone auf die Höhe des Vaginalepithels nachweisen. Zwar spielt auch die Lokalisation innerhalb der Vaginalkanals eine Rolle für die Anzahl an Epithelzellschichten, doch konnte unter Östrogeneinfluß unabhängig vom Ort der Entnahme ein Zuwachs an Zellschichten des *Stratum intermedium* beobachtet werden. Auch beim Schwein ist eine Zunahme der Epitheldicke während der Östrogen-dominanten Phase des Zyklus zu erkennen. Unter Progesteroneinfluß vermindert sich die Anzahl der Epithelzellschichten (DONE und HEARD, 1968). Bei der Hündin beginnt im Proöstrus eine merkliche Vermehrung der Zellschichten, die mit der weiteren Zunahme der peripheren Östrogenkonzentration ihr Maximum erreicht. Dieser östrogenbedingten Proliferation und der damit verbundenen morphologischen Veränderung der Epithelzellen kommt

eine besondere klinische Bedeutung zu, da dieser zur Bestimmung des optimalen Belegungszeitpunkts herangezogen werden kann (POST, 1985; TAMMER et al., 1994). Die Höhe des Vaginalepithels von Schafen hingegen zeigt nach MITCHELL (1972) eine geringe Variation über den gesamten Zyklus. In der genannten Studie konnte nur eine geringe Proliferation des *Stratum intermedium* während der Brunst festgestellt werden, wobei einschränkend zu bemerken ist, daß nur ein Zyklusablauf bei einem einzigen Schaf untersucht wurde. Eine andere, umfangreichere Untersuchung belegte auch für das ovine Vaginalepithel eine deutliche Zellproliferation unter Östrogeneinfluß. Die Epithelhöhe zeigte während des Östrus die maximalste und im Diöstrus die geringste Ausdehnung. Die Anzahl der Zellschichten im *Stratum intermedium* war in der Brunst am größten (REY DE ZORZIN, 1988). Beide Meßgrößen überschreiten die in der eigenen Studie ermittelten Spitzenwerte bei antepartal erkrankten Schafen allerdings deutlich.

Bekannt ist weiterhin, daß eine kurzfristige alimentäre Zufuhr von Phytoöstrogenen zu einer Proliferation des Vaginalepithels bei Schafen führen kann (ADAMS, 1995). Daher muß auch für das Vaginalepithel des Schafes eine Proliferation unter Östrogenwirkung als physiologisch angesehen werden, die durch eine höhere Schichtdicke und eine größere Anzahl an Zellagen gekennzeichnet ist.

Die unter Progesterondominanz stattfindende Reduktion der Epitheldicke ist in der Frühgravidität besonders ausgeprägt, was vor der Einführung der Ultraschalltechnik besonders beim Schwein mittels einer Untersuchung von Vaginalbiopaten zur Graviditätsdiagnose verwendet wurde (DONE und HEARD, 1968). Auch beim Schaf reduziert sich innerhalb der ersten Wochen der Trächtigkeit die Anzahl der Zellschichten, allerdings in geringerem Maße als bei anderen Haussäugetieren (RICHARDSON, 1972). Als charakteristischer für die Differenzierung zwischen graviden und güsten Tieren stellt sich daher die veränderte Morphologie der obersten Zellschicht des *Stratum superficiale* dar, die sich bei tragenden Schafen von dorso-ventral abgeflachten hin zu kuboidalen Formen umwandelt (MITCHELL, 1972; RICHARDSON, 1972).

In den letzten 20 Tagen der Gravidität verschwindet dieses Phänomen. Die oberste Zellage erscheint abgeflacht (RICHARDSON, 1972), was durch die eigenen Resultate an hochgraviden Schafen bestätigt werden kann. Eine Zunahme der Zellschichten in der Hochgravidität wurde von keinem Autor beobachtet. Ein Vergleich der eigenen Arbeit mit den Erkenntnissen während des ovinen Zyklus von



REY DE ZORZIN (1988) zeigt, daß innerhalb der letzten drei Wochen der Gravidität weniger Zellagen existieren als im Progesteron dominierten Diöstrus. Entsprechende Angaben über die Verhältnisse im periparalen Zeitraum, wenn unmittelbar antepartal ein Ansteigen der Östrogenwerte und ein Sinken des Progesteronspiegels einsetzen, fehlen in der Literatur. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen jedoch dafür, daß trotz steigender peripherer Östrogenspiegel aufgrund der physiologischen Veränderung des Verhältnis von Östrogen zu Progesteron i.p. keine Proliferation des Vaginalepithels ausgelöst wird.

Die beobachtete Hyperplasie des Epithels bei Tieren mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. kann wegen der Abwesenheit eines Ödems in tieferen Wandabschnitten nicht mit einem lokalen Hyperöstrogenismus infolge erhöhter Empfindlichkeit des gesamten Vaginalgewebes erklärt werden. Nach REY DE ZORZIN (1988) besteht während des Östrus außer einer Hyperplasie des Epithels, welche die Proliferation bei erkrankten Schafen deutlich übersteigt, auch eine Ödematisierung der subepithelialen Abschnitte der Vaginalwand. Denkbar wäre allerdings eine gegenüber der *Lamina propria mucosae* erhöhte Dichte oder Affinität der Rezeptoren, so daß die Östrogenwirkung nur auf den Epithelzellverband beschränkt bliebe. Dies stünde nicht im Widerspruch zu der verminderten Expressionsrate des Östrogenrezeptors  $\alpha$ , da in der aktuellen Studie der mRNA-Gehalt der gesamten Wandabschnitte der Vagina bestimmt wurde, ohne Rücksicht auf die Verteilung innerhalb des Gewebes. Eine Studie an ovinem Uterusgewebe der Frühträchtigkeit zeigte jedoch, daß die Dichte des Östrogenrezeptors  $\alpha$  in Epithelzellen des *Endometrium* gegenüber dem *Stroma* und dem *Myometrium* durchaus differiert (ZHENG et al., 1996). Hinsichtlich der physiologischen Bindungsaffinität des Östrogenrezeptors  $\alpha$  liegt das Niveau beim Schaf gegenüber dem Rind i.p. deutlich niedriger (KLAUKE und HOFFMANN, 1992), daher könnte eine höhere Affinität unter Umständen enorme Effekte im Gewebe hervorrufen. Möglich wäre ebenfalls, daß Isoformen des ovinen Östrogenrezeptors existieren, die eine größere Rolle in der Vermittlung der Östrogenwirkung spielen als der Östrogenrezeptor  $\alpha$ . Weitere Untersuchungen sind daher notwendig, um die Ursache der Epithelhyperplasie bei den erkrankten Tieren zu klären.

Morphologische Differenzen wiesen besonders die Epithelzellen des *Stratum intermedium* auf. Die Gestalt der Zellen bei erkrankten Tiere stellt sich im Gegensatz zu den anderen Gruppen polygonal dar. Zudem konnte eine ungleichmäßigere Anfärbung des Zytoplasmas festgestellt werden, die auch MITCHELL (1972) in ovinen Vaginalbiopsaten aus der Frühgravidität nachwies. Möglicherweise könnte diese variable Anfärbbarkeit auf eine erhöhte Bildung oder Einlagerung zytoplasmatischer Vakuolen hindeuten. MANABE und YOSHIDA (1986) beobachteten in Fibroblasten der humanen Vagina zum Zeitpunkt der Geburt eine Zunahme lipophiler Granula, deren Inhalt sie eine Funktion bei den Reifungsvorgängen in der Vaginalwand zuweisen. Ob es sich bei den zytoplasmatischen Einlagerungen der Epithelzellen um ähnliche Granula handelt, kann mit der eingesetzten Methode nicht ermittelt werden.

## 5.6. Schlußbetrachtung

Mit der vorliegenden Studie wurden nicht nur die in der Literatur belegten Erkenntnisse hinsichtlich des Elektrolyt- und Steroidhormonhaushalts bei Schafen mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. weitgehend bestätigt (STUBBINGS, 1971; SOBIRAJ et al., 1986; HOFMANN, 1998), sondern auch neue Aspekte der Erkrankung aufgedeckt, die eine Bedeutung für dessen Pathogenese besitzen könnten.

Die in den Expressionsstudien zu graviden Probanden ohne Prolaps ermittelten Differenzen weisen auf Aberrationen im antepartalen Metabolismus des kollagenen Vaginalgewebes erkrankter Tiere hin. Der Vergleich von betroffenen Schafen mit gesunden Probanden i.p. läßt den Schluß zu, daß bei beiden Gruppen ähnliche Vorgänge ablaufen, was die Hypothese einer vorzeitigen Erweichung der Vaginalwand als einem für die Krankheit bedeutenden Faktor unterstützen würde. Ob die Proteinbiosynthese mit den abweichenden Expressionsraten korreliert und somit eine Veränderung der mechanischen Eigenschaften der Vagina eintritt, bleibt in weiterführenden Studien zu untersuchen. Die Ergebnisse einer entsprechenden humanmedizinischen Studie über den prämenopausalen Vaginalprolaps können als hinweisend gelten, daß im betroffenen Gewebe auch geringere Kollagengehalte und

eine erhöhte Kollagenaseaktivität nachweisbar sind (JACKSON et al., 1996). Dies würde bedeuten, daß das Schaf als Modelltier in der Erforschung des humanen Krankheitsbildes dienen könnte.

Trotz zahlreicher früherer Arbeiten und der eigenen, neuen Daten bleibt die Beteiligung der Östrogene an der Entstehung des antepartalen Vaginalprolaps beim Schaf weiterhin unklar. In Übereinstimmung mit der früheren Literatur waren bei erkrankten Tieren keine höheren Östradiol-17 $\beta$  Werte nachweisbar (SOBIRAJ et al., 1986; HOFMANN, 1998). Die vermutete verstärkte lokale Östrogenwirkung aufgrund einer Überexpression des Östrogenrezeptors  $\alpha$  bei erkrankten Schafen konnte widerlegt werden. Eine generelle Ablehnung der Hypothese eines lokalen Hyperöstrogenismus kann jedoch nicht erfolgen, da hierzu die Rezeptordichte und -verteilung innerhalb des Vaginalgewebes sowie die Hormon-Rezeptor-Affinität und andere Isoformen des Rezeptors berücksichtigt werden müssen (KLAUKE und HOFFMANN, 1992; ZHENG et al., 1996; LEUNG et al., 1999). Histologisch fanden sich keine eindeutigen Anzeichen für oder gegen einen verstärkten Östrogeneffekt innerhalb des Gewebes erkrankter Schafe. Die Hyperplasie des Epithels im prolapierten Gewebe könnte durchaus eine Folge östrogenener Wirkung darstellen, da eine Zunahme der Epithelhöhe, allerdings über das hier beobachtete Maß hinaus, während des Östrus beim Schaf nachgewiesen ist (REY DE ZORZIN, 1988). Eine Ödematisierung der *Lamina propria* konnte nur bei Schafen i.p. nachgewiesen werden. Das Gewebe von antepartalen Tieren mit und ohne Prolaps zeigte keine verstärkte Ödematisierung des subepithelialen Bindegewebes. Im Gegensatz dazu ist während des Proöstrus und Östrus in der ovinen Vaginalwand außer der Hyperplasie des Epithels ein Ödem in der *Lamina propria* zu identifizieren (REY DE ZORZIN, 1988).

Insgesamt gelang mit der vorliegenden Studie keine Aufklärung der Pathogenese des ovinen *Prolapsus vaginae ante partum*. Durch die Erkenntnisse aus den Expressionsstudien und der Histologie sind jedoch neue Aspekte der Erkrankung aufgedeckt worden, die eine sinnvolle Ergänzung der bislang bekannten Ätiologie dieser Faktorenerkrankung bilden. Die weitere Erforschung in dieser Richtung könnte Perspektiven einer möglichen Therapie oder Prävention dieses weltweit ökonomisch bedeutenden Krankheitsbildes eröffnen.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Der *Prolaps vaginae ante partum* ist ein seit langem bekanntes Krankheitsbild bei Schafen im letzten Drittel der Gravidität. Trotz umfangreicher klinischer und endokrinologischer Forschung konnte bisher keine befriedigende Erklärung der speziespezifisch signifikanten Häufung dieser antepartalen Störung gegeben werden.

Ziel dieser Studie war es deshalb, neben der Überprüfung der Elektrolythomöostase und der endokrinologischen Situation weitere Erklärungsansätze der Pathogenese des ovinen Vaginalprolaps a.p. zu erhalten. Mittels einer Expressionsstudie ausgewählter Parameter wurde der Bindegewebsstoffwechsel erkrankter Schafe mit dem gesunder, hochgravider Tiere und den Verhältnissen i.p. verglichen. Die Überprüfung der Hypothese einer lokal erhöhten Östrogenwirkung bei erkrankten Probanden erfolgte anhand der mRNA-Expression des Östrogenrezeptors  $\alpha$ . Zusätzlich wurde die Struktur der Vaginalwand von hochgraviden Schafen mit und ohne Vaginalprolaps und Tieren i.p. nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologisch analysiert.

Hierzu wurden von 5 hochgraviden, gesunden Probanden, 4 Schafen i.p. und 6 Tieren mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. Blutproben aus der *Vena jugularis* und Biopsien der Vaginalwand entnommen. Aus dem Blutplasma erfolgte die Bestimmung der Elektrolyte Kalzium, anorganisches Phosphat, Magnesium und Natrium sowie der Konzentration der Steroidhormone Progesteron und Östradiol-17 $\beta$ . Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden mit Hilfe einer RT-PCR durchgeführt und beinhalteten die Analyse der Genexpression der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I, der kollagenolytischen MMP 1, deren Inhibitor TIMP 1 und des Östrogenrezeptors  $\alpha$ . Die semiquantitative mRNA-Bestimmung gelang über eine computergestützte Messung der optischen Dichte der Amplifikatbanden nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem EthBr-gefärbten Agarosegel. Aufgrund der Beschränkungen bei der *in-vivo*-Gewinnung des Probenmaterials konnten nicht alle Ergebnisse direkt miteinander verglichen werden. Daher sind Aussagen über die Veränderungen des Bindegewebsmetabolismus zwischen gesunden Tieren *ante* und *intra partum* nur begrenzt möglich.

Das Alter der Schafe sowie die Anzahl der Lämmer pro Muttertier variierte statistisch nicht signifikant und konnte daher als Einflußfaktor vernachlässigt werden.

Bei den Tieren mit antepartalem Vaginalprolaps lag eine subklinische Hypokalzämie mit mittleren Konzentrationen von  $2,04 \pm 0,15$  mmol/l vor. Die Differenzen zwischen den drei Gruppen erwiesen sich jedoch als statistisch nicht signifikant. Auch die Elektrolyte anorganisches Phosphat, Magnesium und Natrium zeigten keine statistisch abzusichernden Gruppenunterschiede des arithmetischen Mittelwertes.

Die mittlere Hormonkonzentration des Progesterons erkrankter Probanden war mit 61,518 nmol/l, SF 1,327 höher als bei den Kontrolltieren *ante* und *intra partum* ( $\bar{x}_g = 33,189$  nmol/l, SF 1,589 respektive  $\bar{x}_g = 29,393$  nmol/l, SF 1,923). Allerdings ergab sich keine statistische Signifikanz dieser Unterschiede. Für Östradiol-17 $\beta$  konnte eine statistisch nicht abzusichernde Erhöhung der peripheren Plasmawerte bei Tieren mit einem *Prolapsus vaginae* a.p. ( $\bar{x}_g = 102,1$  pmol/l, SF 1,56) gegenüber der graviden Referenzgruppe ( $\bar{x}_g = 73,9$  pmol/l, SF 1,49) ermittelt werden. *Intra partum* lagen die maximalsten Konzentrationen vor ( $\bar{x}_g = 395,6$  pmol/l, SF 11,72).

Die Expressionsstudien ergaben einen Hinweis auf einen antepartal veränderten Kollagenmetabolismus bei Schafen mit einem Vaginalprolaps. Die Expressionsrate der  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I war in prolabiertem Gewebe statistisch signifikant niedriger als bei der hochgraviden Kontrollgruppe ( $p < 0,01$ ). Tendenziell unterschied sich der mittlere mRNA-Gehalt der MMP 1 und des TIMP 1 betroffener Probanden von dem gesunder, hochgravider Tiere durch ein höheres beziehungsweise niedrigeres Niveau. Eine statistische Absicherung der Ergebnisse gelang nicht. Der Östrogenrezeptor  $\alpha$  wurde von Schafen mit einem *Prolapsus vaginae* statistisch signifikant geringer exprimiert als von gesunden Tieren *ante partum*. Zwischen den Verhältnissen i.p. und bei Vorliegen eines antepartalen Vaginalprolaps konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden. In der Tendenz lag aber ein geringfügig niedrigeres Mittelwertniveau für die  $\alpha_2$ -Kette des Kollagen I, MMP1 und den Östrogenrezeptor  $\alpha$  vor.

Die lichtmikroskopisch nachvollziehbaren Differenzen bezogen sich vor allem auf die Höhe und Gestalt des vaginalen Epithels. Subepitheliale Abschnitte der Vaginalwand zeigten nur i.p. eine geringe Ödematisierung, die den anderen Gruppen fehlte. Als Folgen der Passage der Lämmer wurden Ansammlungen von Erythrozyten zwischen Kollagenfasern der *Lamina propria*, eine nach luminal gerichtete Migration von Leukozyten und ein muköser Überzug der Epithelzellen gewertet. Hinweise für eine

Inflammation des prolabierte Vaginalgewebes lagen nicht vor, da leukozytäre Infiltrationsherde in allen Präparaten gleichermaßen zu identifizieren waren. Das *Epithelium vaginae* stellte sich bei Schafen mit einem antepartalen Vaginalprolaps am höchsten heraus ( $\bar{x}_g = 83,95 \mu\text{m}$ , SF 1,21). Die Differenz dieser Gruppe zu den Kontrollproben *ante* ( $\bar{x}_g = 31,12 \mu\text{m}$ , SF 1,22) und *intra partum* ( $\bar{x}_g = 33,27 \mu\text{m}$ , SF 1,24) war statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Begründet wurde dieser Unterschied durch eine Hyperplasie des Vaginalepithels, die bei erkrankten Individuen durch eine statistisch signifikante Zunahme der Zellagen gekennzeichnet war ( $p < 0,0001$ ). Des weiteren variierte die Morphologie der Epithelzellen in prolabiertem Vaginalgewebe hin zu einem mehr polygonalen Aussehen und einer unregelmäßigen Anfärbbarkeit des Zytoplasmas. Die für diese morphologischen Veränderungen verantwortlichen Strukturen waren mit der eingesetzten Methode nicht näher zu charakterisieren.

Die eigenen Ergebnisse bezüglich der Elektrolythomöostase und dem Steroidhormonhaushalt bestätigen die in der Literatur bekannten Verhältnisse bei Schafen mit einem Prolapsus vaginae *ante partum*. Aufgrund der neuen Erkenntnisse der Expressionsstudien kann davon ausgegangen werden, daß in der Ätiologie der Erkrankung eine Störung im vaginalen Bindegewebsstoffwechsel vorliegt. Welche Auswirkungen die veränderten Expressionsraten auf die Proteinbiosynthese haben, bleibt jedoch noch offen. Für die angenommene Hypothese einer vorzeitig ablaufenden Erweichung des prolabierte, kollagenen Bindegewebes konnten durch den Vergleich mit gesunden Tieren i.p. bestätigende Hinweise erzielt werden. Als ätiologischer Faktor muß aufgrund der Resultate eine lokale hyperöstrogene Wirkung innerhalb des Vaginalgewebes durch eine generelle Überexpression des Rezeptors abgelehnt werden. Auch histologisch fanden sich keine Anzeichen einer Östrogenisierung im Sinne einer Ödematisierung des vaginalen Gewebes erkrankter Schafe.

## 7. SUMMARY

Vaginal prolapse *ante partum* is a well known disease during the last third of gestation in sheep. In spite of various clinical and endocrinological investigation the exact cause of the significant accumulated occurrence of this prepartum disorder in ewes has not been ascertained.

The aim of this study was to prove the plasma electrolyte concentrations and hormone profiles and, in addition, to obtain further aspects of the pathogenesis of the ovine vaginal prolapse in late gestation. By means of an expression study the connective tissue metabolism of the vaginal wall in affected and unaffected pregnant sheep and ewes during parturition was examined. The hypothesis of an increased estrogenic effect was tested by the estimation of the mRNA-level of the estrogen receptor  $\alpha$ . Additionally, the morphology of the vaginal wall of ewes with and without vaginal prolapse and animals intra partum was examined after Haematoxylin-Eosin-staining.

Blood samples from the jugular vein and biopsies of the vaginal tissue were taken from 5 heavily pregnant, unaffected animals, 4 sheep during parturition and 6 ewes suffering from vaginal prolapse ante partum. The blood samples were submitted for calcium, inorganic phosphorus, magnesium and sodium estimation and for determining the concentration of the steroid hormones progesterone and estradiol-17 $\beta$ . Investigations in the mRNA-expression including the estimation of the transcript levels of the  $\alpha_2$ -chain of collagen I, the collagenolytic MMP 1, its inhibitor TIMP 1 and the estrogen receptor  $\alpha$  were carried out by using RT-PCR. Semiquantitative determination of mRNA levels was performed by using a computer program to estimate the optical density of the resulting bands on an ethidiumbromide stained agarose gel. Due to the restrictions with the obtaining of the tissue samples in-vivo not all results could be compared with one another. Therefore only limited comment of differences in the metabolism of the connective tissue between healthy animals ante and intra partum is possible.

Since the age of the sheep as well as the average number of lambs per dam showed no statistical significant difference both could be neglected as an influencing factor. Animals suffering from antepartum vaginal prolapse showed subclinical hypocalcaemia with an average concentration of  $2,04 \pm 0,15$  mmol/l. The differences

between the 3 groups did not prove statistical significance. Also the electrolytes inorganic phosphorus, magnesium and sodium did not show group differences of the arithmetic mean which can be secured statistically.

The average progesterone concentration of affected ewes ( $\bar{x}_g = 61,518$  nmol/l, SF 1,327) was above those of control animals *ante* and *intra partum* ( $\bar{x}_g = 33,189$  nmol/l, SF 1,581,  $\bar{x}_g = 29,393$  nmol/l, SF 1,923, respectively). However no significant differences were noticed. In reaction to pregnant control group ( $\bar{x}_g = 73,9$  pmol/l, SF 1,49) the plasma levels of estradiol-17 $\beta$  in animals suffering from antepartum vaginal prolapse ( $\bar{x}_g = 102,1$  pmol/l, SF 1,56) were increased, but without statistical insurance. The maximum concentration was measured during parturition ( $\bar{x}_g = 395,6$  pmol/l, SF 11,75).

The analysis of the mRNA expression pointed out a distinct change in the antepartum collagen metabolism in sheep suffering from vaginal prolapse. In prolapsed tissue the  $\alpha_2$ -chain of collagen I showed a decreased expression level in relation to heavily pregnant control animals ( $p < 0,01$ ). The average mRNA-synthesis of MMP 1 and TIMP 1 in affected ewes varied from those in healthy, heavily pregnant sheep by a higher and/or lower level. Significant differences could not be noticed. The production of transcripts of the estrogen receptor  $\alpha$  by sheep suffering from vaginal prolapse was decreased significantly in comparison to unaffected pregnant ewes. There was no statistical insurance in the differences between intrapartum sheep and ewes with prolapsed vaginal wall. However, the average level of the  $\alpha_2$ -chain of collagen I, MMP 1 and estrogen receptor  $\alpha$  were somewhat lower in affected animals.

In the light microscopic study, differences were noted in height and morphology of the vaginal epithelium. Edema was pronounced only in the subepithelial zone of the vaginal wall of intrapartum sheep and was not found in other groups. Accumulation of erythrocytes between the collagen fibres of the *Lamina propria*, migration of leucocytes to the luminal site and mucus covering the epithelial cells were explained by the passage of the lambs. There was no evidence for an inflammation into the prolapsed vaginal tissue since infiltration of leucocytes was present in all samples, equally. The highest vaginal epithelium was identified in sheep suffering from antepartum vaginal prolapse ( $\bar{x}_g = 83,95$   $\mu\text{m}$ , SF 1,21). This difference showed statistical insurance to both control groups, *ante* ( $\bar{x}_g = 31,12$   $\mu\text{m}$ , SF 1,22) and *intra partum* ( $\bar{x}_g = 33,27$   $\mu\text{m}$ , SF 1,24), respectively ( $p < 0,0001$ ). The increase in epithelial



height was due to hyperplasia of the epithelial cells, which was characterized by a statistically significant increased number of cell layers with ewes suffering from vaginal prolapse ( $p < 0,0001$ ). Additionally, the morphology of epithelial cells in prolapsed tissue varied showing a polygonal shape and a fainter, less uniform staining of the cytoplasm. The physiologic implications of the observed morphological changes could not be given by the methods used in this study.

The own results concerning the electrolytes and steroid hormones in sheep suffering from vaginal prolapse *ante partum* agreed with further observations by other investigators. The new results argue in favour of a disorder in the collagen metabolism of vaginal connective tissue as an aspect in pathogenesis of this disease. The effect of the changed expression levels to the protein biosynthesis remain obscure. The supposed premature softening of the prolapsed vaginal connective tissue could be confirmed by the comparison with healthy ewes *intra partum*. An increased estrogenic effect onto the vaginal tissue due to an over expression of its receptor must be rejected. There were also no histological signs of an increased estrogenic effect within the vaginal tissue of affected sheep.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

**ADAMS, N. R. (1995):**

Organizational and activational effects of phytoestrogens on the reproductive tract of the ewe.

Proc Soc Exp Biol Med, 208, 87-91.

**AUGHEY, E., CALDER, A. A., COUTTS, J. R. T., FLEMING, R., McMANUS, T. J., MUNRO, C. D. (1983):**

Pregnancy-associated changes in the physical and microscopic characteristics of the ovine cervix.

J Anat, 136, 389-399.

**AUMAILLEY, M., GAYRAUD, B. (1998):**

Structure and biological activity of the extracellular matrix.

J Mol Med, 76, 253-265.

**AYEN, E., NOAKES, D. E. (1997):**

Displacement of the tubular genital tract of the ewe during pregnancy.

Vet Rec, 141, 509-512.

**AYEN, E., NOAKES, D. E. (1998):**

Distribution of collagen in the vaginal wall of ewes.

Vet Rec, 155, 213-215.

**AYEN, E., NOAKES, D. E., BAKER, S. J. (1998):**

Changes in the capacity of the vagina and the compliance of the vaginal wall in ovariectomized, normal cyclical and pregnant ewes, before and after treatment with exogenous oestradiol and progesterone.

Vet J, 156, 133-143.

**BASSETT, J. M., OXBORROW, T. J., SMITH, I. D., THORBURN, G. D. (1969):**

The concentration of progesterone in the peripheral plasma of the pregnant ewe.  
J Endocrinol, 45, 449-457.

**BICKHARDT, K. (1993):**

Prolapsus vaginae.

In: Busch, W., Schulz, J. (Hrsg.): Geburtshilfe bei Haustieren. 1. Aufl., G. Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 518-520.

**BICKHARDT, K., KÖNIG, G. (1985):**

Blutmeßwerte von gesunden Mutterschafen der Merino- und Schwarzkopfrasse zur Zeit der Geburt.

Dtsch Tierärztl Wschr, 92, 319-322.

**BLEUL, U., HAUSER, B. (1998):**

Hernia perinealis bei einem Schaf.

Tierärztl Prax, 26 (G), 108-109; 148-150.

**BOLLWAHN, W., SCHWESIG, K. P. (1987):**

Die extradurale Alkoholblockade der Sakralnerven zur Prolapsbehandlung bei Mutterschafen.

Tierärztl Umschau, 42, 455-460.

**BOSMANN, F. T., STAMENKOVIC, I. (2003):**

Functional structure and composition of the extracellular matrix.

J Pathol, 200, 423-428.

**BOSTEDT, H. (1988):**

Zu Problemen in der Peripartalperiode des Schafes: Ergebnisse einiger Untersuchungen.

Prakt Tierarzt, 69, 24-29.

**BOSTEDT, H. (1996a):**

Trächtigkeitsdiagnose beim Schaf.

In: Bostedt, H., Dedié, K. (Hrsg.): Schaf- und Ziegenkrankheiten. 2. Aufl., Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 469-476.

**BOSTEDT, H. (1996b):**

Scheidenvorfall.

In: Bostedt, H., Dedié, K. (Hrsg.): Schaf- und Ziegenkrankheiten. 2. Aufl., Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 494-499.

**BOSTEDT, H., BERCHTOLD, M., GRASSLER, R. (1972):**

Graviditäts-Diagnose beim Schaf mit Hilfe von Zervikalschleim-Untersuchungen.

Schweiz Arch Tierheilk, 114, 119-128.

**BOSTEDT, H., HAUSMANN, C. (1980):**

Einfluß von fortgeschrittener Gravidität, Geburt und früher Laktationsperiode auf Elektrolytkonzentrationen im Blutserum von Schafen unter besonderer Berücksichtigung des Festliegens ante partum.

Prakt Tierarzt, 61, 482-486.

**BREW, K., DINAKARPANDIAN, D., NAGASE, H. (2000):**

Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.

Biochim Biophys Acta, 1477, 267-283.

**BÜHNER, F. (1958):**

Eine einfache chirurgische Verschlußmethode für alle Scheiden- und Uterusvorfälle.

Tierärztl Umschau, 13, 183-187.

**BUSCH, W. (2001):**

Gestörter Trächtigkeitsverlauf.

In: Behrens, H., Ganter, M., Hiepe, T. (Hrsg.): Lehrbuch der Schafkrankheiten. 4. Aufl., Paul Parey Verlag, Berlin, 71-78.

**CLARK, I. M., POWELL, L. K., CAWSTON, T. E. (1994):**

Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) stimulates the secretion of collagenase from human skin fibroblasts.

Biochem Biophys Res Commun, 203, 874-880.

**CURRY, T. E., OSTEEN, K. G. (2001):**

Cyclic changes in the matrix metalloproteinase system in the ovary and uterus.

Biol Reprod, 64, 1285-1296.

**DE BOIS, C. H. W., VAN DER WEIJDEN, G. C. (1993):**

Inversio et Prolapsus vaginae.

In: Richter, R., Goetze, R. (Hrsg.): Tiergeburtshilfe. 4. Aufl., Paul Parey Verlag, Berlin, 155-168.

**DILLWORTH, D. D., McCARREY, J. R. (1992):**

Single-step elimination of contaminating DNA prior to reverse transcriptase PCR.

PCR Methods Appl, 1, 279-282.

**DIXON, W. J. (1993):**

BMDP Statistical Software Manual.

Volume 1, 2 and 3, University of California Press, Berkley, Los Angeles, London.

**DONE, J. T., HEARD, T. W. (1968):**

Early pregnancy diagnosis in the sow by vaginal biopsy.

Vet Rec, 82, 64-68.

**EDGAR, D. G. (1952):**

Vaginal eversion in the pregnant ewe.

Vet Rec, 64, 852-858.

**EITEL, J. (1990):**

Geburtsstörungen bei der Ziege: Art und Häufigkeit von Geburtsstörungen und peripartalen Komplikationen in Ziegenbeständen einer tierärztlichen Praxis in der Südschweiz.

Diss Vet Med, Zürich.

**ELLWOOD, D. A., ANDERSON, A. B. M., MITCHELL, M. D., MURPHY, G., TURNBULL, A. C. (1981):**

Prostanoids, collagenase and cervical softening in the sheep.

In: Ellwood, D. A., Anderson, A. B. M. (Hrsg.): The cervix in pregnancy and labour. Clinical and biochemical investigations. Aufl., Churchill-Livingston, New York, 57-73.

**FOSANG, A. J., HANDLEY, C. J., SANTER, V., LOWTHER, D. A., THORBURN, G. D. (1984):**

Pregnancy-related changes in the connective tissue of the ovine cervix.

Biol Reprod, 30, 1223-1235.

**FOWLER, N. G., EVANS, D. A. (1957):**

A new vaginal retainer for the ewe.

Vet Rec, 69, 509-510.

**HALBERT, G. W., DOBSON, H., WALTON, J. S., BUCKRELL, B. C. (1990):**

The structure of the cervical canal of the ewe.

Theriogenology, 33, 977-992.

**HARRIS, E. D., KRANE, S. M. (1974):**

Collagenases.

New Engl J Med, 291, 557-563.

**HARTIGAN, P. J. (1961):**

Artificial pneumoperitoneum in the treatment of vaginocervical prolapse in the ewe.

Irish Vet J, 15, 169-172.

**HARTWIG, H. (1993):**

Entwicklung der normalen Gravidität.

In: Busch, W., Schulz, J. (Hrsg.): Geburtshilfe bei Haustieren. 1. Auflage Aufl., G. Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 57-102.

**HASHIZUME, K., TAKAHKSHI, T., KOHSAKA, T., SATO, T., ITO, A. (1997):**

Matrix metalloproteinases production and tissue inhibitor of metalloproteinases production in bovine placenta and uterine tissues during early pregnancy.

Theriogenology, 47, 323.

**HERTRAMPF, B., WILKENS, H., FIEDLER, H. H., BOLLWAHN, W. (1978):**

Anaesthesie der Sakralnerven im Rahmen der Prolapsbehandlung von Mutterschafen.

Berl Münch Tierärztl Wschr, 91, 222-227.

**HOFFMANN, B. (1993):**

Endokrinologie der Hochträchtigkeit, während des Partus und im Puerperium.

In: Richter, R., R, G. (Hrsg.): Tiergeburtshilfe. 4. Aufl., Paul Parey Verlag, Berlin, 111-122.

**HOFFMANN, B., KYREIN, H. J., ENDER, M. L. (1973):**

An efficient procedure for the determination of progesterone by immunoassay applied to bovine peripheral plasma.

Horm Res, 4, 302-310.

**HOFMANN, H. (1998):**

Klinisch-chemische sowie hormonanalytische Untersuchungen im Blutserum von Schafen mit *Inversio et Prolapsus vaginae ante partum*.

Diss Vet Med, Giessen.

**HORIKOSHI, T., SAKAKIBARA, M. (2000):**

Quantification of relative mRNA expression in the rat brain using simple RT-PCR and ethidium bromide staining.

J Neuroscience Methods, 99, 45-51.

**HOSIE, B. D. (1989):**

Vaginal prolapse and rupture in sheep.

In Practice, 11, 215-218.

**HOSIE, B. D., LOW, J. C., BRADLEY, H. K., ROBB, J. (1991):**

Nutritional factors associated with vaginal prolapse in ewes.

Vet Rec, 128, 204-208.

**HUANG, Z., FASCO, M. J., KAMINSKY, L. S. (1996):**

Optimization of DNase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR.

BioTechniques, 20, 1012-1020.

**JACKSON, S. R., AVERY, N. C., TARLTON, J. F., ECKFORD, S. D., ABRAMS, P., BAILEY, A. J. (1996):**

Changes in metabolism of collagen in genitourinary prolapse.

Lancet, 347, 1658-1661.

**JEFFREY, J. J. (1991):**

Collagen and collagenase: Pregnancy and parturition.

Semin Perinatol, 15, 118-126.

**JUNQUEIRA, L. C., MONTES, G. S. (1983):**

Biology of collagen-proteoglycan interaction.

Arch Histol Jpn, 46, 589-629.

**JUNQUEIRA, L. C. U., ZUGAIB, M., MONTES, G. S., TOLEDO, O. M. S., KRISZTAN, R. M., SHIGIHARA, K. M. (1980):**

Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leucocytes during cervical dilation.

Am J Obstet Gynecol, 138, 273-281.



**KAULFUSS, K. H., UHLICH, K., GILLE, U. (1998):**

Ultrasonographische Untersuchungen zum Plazentomwachstum beim trächtigen Schaf.

Dtsch Tierärztl Wschr, 105, 162-167.

**KLAUKE, M., HOFFMANN, B. (1992):**

Progesterone and estrogen receptors in the myometrium of the cow during the oestrus cycle and pregnancy and of the sheep at the time of parturition.

Anim Reprod Sci, 29, 195-203.

**KLOSS, S., WEHREND, A., FAILING, K., BOSTEDT, H. (2002):**

Erhebungen zur Art und Häufigkeit mechanischer Geburtsstörungen beim Schaf unter besonderer Berücksichtigung des Prolapsus vaginae ante partum.

Berl Münch Tierärztl Wschr, 115, 247-251.

**KNOTTENBELT, D. C. (1988):**

Vaginal rupture associated with herniation of abdominal viscera in pregnant ewes.

Vet Rec, 122, 453-456.

**KRISTINSSON, G., WISSDORF, H. (1985):**

Bau der Cervix uteri und Verlauf des Canalis cervicis uteri beim Schaf.

Tierärztl Prax, 13, 299-305.

**LANG, J. H., ZHU, L., SUN, Z. J., CHEN, J. (2003):**

Estrogen levels and estrogen receptors in patients with stress urinary incontinence and pelvic organ prolapse.

Int J Gynaecol Obstet, 80, 35-39.

**LEISER, R. (1990):**

Weibliche Geschlechtsorgane.

In: Mosimann, W., Kohler, T. (Hrsg.): Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haussäugetiere. 1. Aufl., Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg, 232-248.

**LEISER, R. (1999):**

Weibliche Geschlechtsorgane - Allgemeine und vergleichende Betrachtung.

In: Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (Hrsg.): Lehrbuch der Anatomie der Haustiere - Band II. 8. Aufl., Parey Buchverlag, Berlin, 393-412.

**LEUNG, T. S., WATHES, C. D., YOUNG, R. I., JENKIN, G. (1999):**

Effect of labor induction on the expression of oxytocin receptor, cytochrome P450 aromatase and estradiol receptor in the reproductive tract of the late pregnant ewe.

Biol Reprod, 60, 814-820.

**LIEBICH, H. G. (1999a):**

Weibliche Geschlechtsorgane.

In: Liebich, H. G. (Hrsg.): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. 3. Auflage Aufl., Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 284-302.

**LIEBICH, H. G. (1999b):**

Binde- und Stützgewebe.

In: Liebich, H. G. (Hrsg.): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. 3. Auflage Aufl., Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, 52-81.

**LILLIE, R. D., FULLMER, H. M. (1976):**

Histopathologic technic and practical histochemistry.

The Blakiston Company, New York.

**LOW, J. C., SUTHERLAND, H. K. (1987):**

A census of the prevalence of vaginal prolapse in sheep flocks in the Borders region of Scotland.

Vet Rec, 120, 571-575.

**LUQUE, E. H., BASSANI, M. M., RAMOS, J. G., MAFFINI, M., CANAL, A., KASS, L., CALDINI, E. G., FERREIRA, J. M. C., MUNOZ DE TORO, M., MONTES, G. S. (1997):**

Leucocyte infiltration and collagenolysis in cervical tissue from intrapartum sheep.

J Vet Med A, 44, 501-510.

**LUQUE, E. H., RAMOS, J. G., RODRIGUEZ, H., MUNOZ DE TORO, M. M. (1996):**

Dissociation in the control of cervical eosinophilic infiltration and collagenolysis at the end of pregnancy or after pseudopregnancy in ovariectomised-steroid treated rats.

Biol Reprod, 55, 1206-1212.

**MANABE, Y., YOSHIDA, Y. (1986):**

Collagenolysis in human vaginal connective tissue during pregnancy and delivery: A light and electron microscopic study.

Am J Obstet Gynecol, 155, 1060-1066.

**MARONE, M., MOZZETTI, S., DE RITIS, D., PIERELLI, L., SCAMBIA, G. (2001):**

Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample.

Biol Proced Online, 3, 19-25.

**McGRAW, R. A., STEFFE, E. K., BAXTER, S. M. (1990):**

Sequence-dependent oligonucleotide-target duplex stability: rules from empirical studies with a set of twenty-mers.

BioTechniques, 8, 674-678.

**McLEAN, J. W. (1956):**

Vaginal prolapse in the sheep.

N Z Vet J, 4, 38-55.

**MITCHELL, D. (1972):**

Vaginal biopsy as a method for diagnosing pregnancy in the ewe.

Vet Rec, 91, 161-165.

**MORE, J. (1984):**

Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights.

Acta Anat (Basel), 120, 156-159.

**NASH, M. A., LENZI, R., PLATSOUCAS, C. D., FREEDMAN, R. S. (1998):**

RT-PCR quantitation of cytokine responses in vivo from specimens containing small numbers of cells during bioimmunotherapy.

J Immunol Methods, 219, 169-179.

**NOAKES, D. E. (2001):**

Prolapse of the vagina and cervix.

In: Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W. (Hrsg.): Arthur's veterinary reproduction and obstetrics. 8. Aufl., W. B. Saunders, London, 145-153.

**OLSEN, B. R., NINOMIYA, Y. (1999):**

Fibrillar collagens.

In: Kreis, T., Vale, R. (Hrsg.): Guidebook to the extracellular matrix, anchor and adhesion proteins. Sambrook and Tooze Publications at Oxford University Press, Oxford, 383-387.

**OSMERS, R., RATH, W., ADELMANN-GRILL, B. C., FITTKOW, C., KULOCZIK, M., SZEVERENYI, M., TSCHESCHE, H., KUHN, W. (1992):**

Origin of cervical collagenase during parturition.

Am J Obstet Gynecol, 166, 1455-1460.

**OWINY, J. R., FITZPATRICK, R. J., SPILLER, D. G., APPLETON, J. (1987):**

Scanning electron microscopy of the wall of the ovine cervix uteri in relation to tensile strength at parturition.

Res Vet Sci, 43, 36-43.

**OWINY, J. R., FITZPATRICK, R. J., SPILLER, D. G., DOBSON, H. (1991):**

Mechanical properties of the ovine cervix during pregnancy, labour and immediately after parturition.

Br Vet J, 147, 432-436.

**OWINY, J. R., GILBERT, R. O., WAHL, C. H., NATHANIELSZ, P. W. (1995):**

Leucocyte invasion of the ovine cervix at parturition.

J Soc Gynecol Invest, 2, 593-596.

**PAPA, P. (2001):**

Darstellung von Estradiol-17 $\beta$  und Progesteronrezeptoren im Corpus luteum der Hündin zu definierten Zeitpunkten im Östrus und Diöstrus.

Diss Vet Med, Giessen.

**POST, K. (1985):**

Canine vaginal cytology during the estrous cycle.

Can Vet J, 26, 101-104.

**PRIEDKALNS, J. (1987):**

Female reproductive tissue.

In: Dellmann, H. D., Brown, E. M. (Hrsg.): Textbook of veterinary histology. 3. Ed. Aufl., Lea and Febiger, Philadelphia, 313-339.

**REGASSA, F., NOAKES, D. E. (2001):**

Changes in the wheight, collagen concentration and content of the uterus and cervix of the ewe during pregnancy.

Res Vet Sci, 70, 61-66.

**REY DE ZORZIN, M. C. (1988):**

Histomorphologische und histochemische Veränderungen am Genitaltrakt des weiblichen Schafes im Verlaufe eines Sexualzyklus.

Diss Vet Med, Hannover.

**RICHARDSON, C. (1972):**

Pregnancy diagnosis in the ewe: a review.

Vet Rec, 90, 264-275.

**ROBERTSON, H. A., SMEATON, T. C. (1973):**

The concentration of unconjugated oestrone, oestroneulphate and oestradiol-17 $\beta$  in the maternal plasma of the pregnant ewe in relation to the initiation of birth and lactation.

J Reprod Fert, 35, 461-468.

**RÜSCH, P., BERCHTOLD, M. (1978):**

Scheidenvorfall beim Schaf -Therapie und Geburtsverlauf.

Schweiz Arch Tierheilk, 120, 3-12.

**RÜSSE, I., GRUNERT, E. (1993):**

Genitale Graviditätsveränderungen.

In: Richter, R., Götze, R. (Hrsg.): Tiergeburtschilfe. 4. Aufl., Paul Parey Verlag, Berlin, 58-61.

**RYCHLIK, W. (1995):**

Selection of primers for polymerase chain reaction.

Mol Biotechnol, 3, 129-134.

**SAMBROOK, J. (1989):**

Molecular cloning: A laboratory manual.

Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

**SATO, T., ITO, A., MORI, Y., YAMASHITA, K., HAYAKAWA, T., NAGASE, H. (1991):**

Hormonal regulation of collagenolysis in uterine cervical fibroblasts.

Biochem J, 275, 645-650.

**SCHNORR, B., KRESSIN, M. (2001):**

Entwicklung der Geschlechtsorgane.

In: Schnorr, B., Kressin, M. (Hrsg.): Embryologie der Haustiere. 4. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart , New York, 180-197.

**SCHUH, R. (1993):**

Histomorphometrische Untersuchungen an der Cervix uteri bei Katze, Hund, Schaf, Rind und Pferd.

Diss Vet Med, München.

**SCOTT, P. R., GESSERT, M. E. (1998):**

Ultrasonographic examination of 12 ovine vaginal prolapses.

Vet J, 155, 323-324.

**SCOTT, P. R., SARGISON, N. D., PENNY, C. D., STRACHAN, W. D. (1995):**

The use of combined xylazine and lignocaine epidural injection in ewes with vaginal or uterine prolapses.

Theriogenology, 43, 1175-1178.

**SMOLLICH, A. (1992):**

Weibliches Geschlechtssystem.

In: Smollich, A., Michel, G. (Hrsg.): Mikroskopische Anatomie der Haustiere. 2. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, 281-335.

**SOBIRAJ, A. (1990):**

Der Prolaps vaginae ante partum beim Schaf - ein ungelöstes Problem.

Tierärztl Prax, 18, 9-12.

**SOBIRAJ, A. (1994):**

Geburtsschwierigkeiten bei Schaf und Ziege - Auswertung des Patientenaufkommens aus sieben Ablampperioden an einer geburtshilflichen Klinik.

Dtsch Tierärztl Wschr, 101, 471-476.

**SOBIRAJ, A., BUSSE, G., GIPS, H., BOSTEDT, H. (1986):**

Investigations into the blood plasma profiles of electrolytes, 17 $\beta$ -oestradiol and progesterone in sheep suffering from vaginal inversion and prolapse ante partum.

Br Vet J, 142, 218-223.

**STUBBINGS, D. P. (1971):**

Observations on serum calcium levels in ewes in North Lincolnshire in relation to prolapse of the vagina and incomplete cervical dilatation.

Vet Rec, 89, 296-300.

**TAMMER, I., BLENDINGER, K., SOBIRAJ, A., BOSTEDT, H. (1994):**

Über den Einsatz der exfoliativen Vaginalzytologie im Rahmen der gynäkologischen Befunderhebung bei der Hündin.

Tierärztl Prax, 22, 199-207.

**THORBURN, G. D., CHALLIS, J. R. C., CURRIE, W. B. (1977):**

Control of parturition in domestic animals.

Biol Reprod, 16, 18-27.

**VISSE, R., NAGASE, H. (2003):**

Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases.

Circ Res, 92, 827-839.

**WEHREND, A. (1997):**

Untersuchungen zur Genexpression von Kumulus-Oozyten-Komplexen von *Sus scrofa f.d.* während der in-vitro-Reifung.

Diss Vet Med, Hannover.

**WEHREND, A., BOSTEDT, H. (2004):**

Untersuchungen zur speziesspezifischen Bedeutung der Zervix als Dystokieursache.

Tierärztl Umsch, im Druck

**WESTERGREN-THORSSON, G., NORMAN, M., BJÖRNSSON, S., ENDRESEN, U., STJERNHOLM, Y., EKMAN, G., MALMSTRÖM, A. (1998):**

Differential expressions of mRNA for proteoglycans, collagens and transforming growth factor- $\beta$  in the human cervix during pregnancy and involution.

Biochim Biophys Acta, 1406, 203-213.

**WOESSNER, J. F. (1991):**

Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling.

FASEB J, 5, 2145-2154.



**WROBEL, K. H., LAUN, G., HEES, H., ZWACK, M. (1986):**

Histologische und ultrastrukturelle Untersuchungen am Vaginalepithel des Rindes.  
Anat Histol Embryol, 15, 303-328.

**WU, W. X., MYERS, D. A., NATHANIELSZ, P. W. (1995):**

Changes in the estrogen receptor messenger ribonucleic acid in sheep fetal and maternal tissues during late gestation and labor.  
Am J Obstet Gynecol, 172, 844-850.

**ZHENG, J., JOHNSON, M. L., REYNOLDS, L. P. (1996):**

Estrogen and progesterone receptors, cell proliferation and c-fos expression in the ovine uterus during early pregnancy.  
Endocrinology, 137, 340-348.

## 9. ANHANG

### 9.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Ammonium-heparinisierte Plasmaröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Bildanalyseprogramm „Leica Image Manager“	Leika, Wetzlar
Chemielumeniszensgerät „ACS:180“	Bayer Diagnostics, Fernwald
Deckgläser	Menzel-Gläser
Elektrophoresesystem „Wide Mini Sub Cell GT“	Bio Rad Laboratories, München
EML 105 Elektrolyt Metabolit Analysator	Radiometer, Copenhagen
Euparal	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Filterpipettenspitzen	AHN Biotechnology, Nordhausen
Flammenphotometer „EFOX 5053“	Eppendorf-Nether-Hinz GmbH, Hamburg
Geldokumentation „Phoretix Grabber“	Nonlinear Dynamics, Newcastle
Kühlzentrifuge „Biofuge Fresco“	Heraeus Instruments, Osterode
Mastercycler Gradient	Eppendorf-Nether-Hinz GmbH, Hamburg
Microm	Laborgeräte GmbH; Heidelberg
Mikroskop DMR	Leika, Wetzlar
Mikrotom	Reichardt Jung AG; Heidelberg
Kamerasystem „Phoretix Grabber“	Nonlinear Dynamics, Newcastle
Objektträger	Knittel-Gläser
Photometer „Smart Spec 3000“	Bio Rad Laboratories, München
Pipettensatz Modell 5000	Nichiryo Co. Ltd., Tokio
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf
Reaktionsgefäße 2,0 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Schüttelgerät „VF2“	IKA-Werke, Staufen i. Br.
Serum-Monovette	Sarstedt, Nümbrecht
Spannungsgerät „Bluepower 500“	Serva Electrophoresis, Heidelberg

Sterile Einmalkanüle (1,2 x 40 mm)	Braun, Melsungen
Thermoblock „TM 130-6“	HLC Heap Labour Consult, Bovenden
Thermotube PCR Tubes 0,2 ml	Peq Lab, Erlangen
Total Lab Phoretix 1D	Nonlinear Dynamics, Newcastle
Ultra Turrax	IKA-Werke, Staufen i. Br.
Vakuumzentrifuge „Rotovac 3“	Biotech-Fischer, Reiskirchen
Autoklav	Welber, Bad Schwartau

## 9.2. Chemikalien und Enzyme

6x Loading Dye Solution	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
Alkoholische Anilinlösung	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Cloralhydrat	Merck, Darmstadt
dATP, Desoxyadenosintriphosphat	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
dCTP, Desoxycytidintriphosphat	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
DEPC, Diethylpyrocarbonat	Amresco, Solon, Ohio
dGTP, Desoxyguanosintriphosphat	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
DNAse I (10U/µl)	Amersham Biosciences Europe, Feiburg
dTTP, Desoxythymidintriphosphat	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma, Deisenhofen
Eosin	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd, 37%ig	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Formol (40%)	Merck, Darmstadt
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot

Gold Universal Agarose	Peq Lab, Erlangen
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
JetSorb	Genomed, Bad Oeynhausen
Kalialaun	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub> , (25 mM)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
M-MLV-RT (200U/μl)	Promega GmbH, Mannheim
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
NaSO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Natronlauge (4N)	Merck, Darmstadt
Oligo-(dt)-Primer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Oligonucleotidprimer (10μM)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PCR-Puffer mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10x)	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
Rekombinantes Rnasin (40U/μl)	Promega GmbH, Mannheim
RNagents Total RNA Isolation System	Promega GmbH, Mannheim
RT-Puffer (5x)	Promega GmbH, Mannheim
Taq DNA-Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

### 9.3. Lösungen

Agarosegel, 1%ig:

1,0 g Agarose, 1x TAE-Puffer ad 100 ml. Bis zum Sieden erhitzen, abkühlen lassen, in die Gelform ausgießen und anschließend bei Raumtemperatur 25 Min. polymerisieren lassen

DEPC-Wasser:

1,0 ml DEPC, ad 1000 ml Aqua bidest.. Ansatz über Nacht bei + 4° C stehen lassen, abschließend 20 Min. bei 121 °C autoklavieren

dNTP-Mix (10 mM):

10 µl dATP, 10 µl dCTP, 10 µl dGTP, 10 µl dTTP, ad 100 µl DEPC-Wasser

dNTP-Mix (2 mM):

20 µl dNTP-Gemisch (10 mM), ad 100 µl DEPC-Wasser

EthBr-Färbelösung:

0,1 mg EthBr, ad 1000 ml DEPC-Wasser

Formaldehyd-Agsarosegel, 1%ig:

1,0 g Agarose, 97,3 ml 1x TAE-Puffer, bis zum Sieden erhitzen. Nach einer Abkühlung auf ungefähr 45 °C Zugabe von 2,7 ml Formaldehyd, mischen durch leichtes Schwenken, danach sofortiges Ausgießen in die Gelform. 25 Min. Polymerisation bei Raumtemperatur.

Hämatoxylin nach MEYER:

1 g Hämatoxylin, 1000 ml A. bidest. unter schütteln lösen, 0,2 g NaSO<sub>3</sub>, 50 g Kalialaun, 50 g Cloralhydrat und 1 g Zitronensäure zufügen und 2 - 3 Tage stehen lassen, dann filtrieren

Natriumphosphat-Puffer (0,1 M; pH 7,2):

Lösung 1 (0,1 M): 13,8 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, ad 1000 ml A. dest

Lösung 2 (0,1 M): 17,8 g NaHPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, ad 1000 ml A. dest

Gebrauchslösung: 28,3 ml Lösung 1, 71,7 ml Lösung 2

Neutrales gepuffertes Formol nach Lillie:

100 ml Formol (40%), 4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 6,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 900 ml A. dest.

RNA-Auftragspuffer:

100 µl Bromphenolblau, 80 µl 0,5 M EDTA, 720 µl Formaldehyd 37 %ig, 3080 µl Formamid, 1,5 g Ficoll, ad 1200 µl DEPC-Wasser

TAE-Laufpuffer (pH 8,0),:

Stammlösung 50fach (50x): 242 g TRIS-Base, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA, ad 1000 ml DEPC-Wasser

Gebrauchslösung 1fach (1x): 20 ml TAE 50x, ad 1000 ml DEPC-Wasser

**9.4. Abkürzungsverzeichnis**

$\bar{x}_a$	Arithmetischer Mittelwert
$\bar{x}_g$	Geometrischer Mittelwert
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
a.p.	<i>ante partum</i>
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA
COL1 A2	$\alpha_2$ -Kette des (Pro-) Kollagen I
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	DNA abbauendes Enzym
DSK	Deutsches Schwarzköpfiges Fleischschaf
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor $\alpha$
EthBr	Ethidiumbromid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gesamt-RNA	Gemisch aller vorhandenen RNA-Arten
i.p.	<i>intra partum</i>
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
l	Liter
LAN	Lokales Rechnernetzwerk
M	Molar
Max	Maximum der Meßwerte
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Min	Minimum der Meßwerte

---

Min.	Minute
ml	Milliliter
M-MLV	Molony Murine Leukaemia Virus
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	Boten-(messenger)-RNA
N	Normal
n	Stichprobenumfang
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
OD	Optische Dichte
OD <sub>260 nm</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm
p.p.	<i>post partum</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	RNA abbauendes Enzym
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
Sek.	Sekunde
SF	Streufaktor
TAE-Puffer	Trisazetatelektrophorese-Puffer
T <sub>an</sub>	Annealing-Temperatur
Taq	DNA-Polymerase aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute



## **Danksagung**

Nach Abschluß der Arbeit möchte ich denjenigen danken, die zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. Dr. h.c. H. Bostedt und Privatdozent Dr. A. Wehrend für die Überlassung des interessanten Themas und die mir stets gewährte Unterstützung und Motivation bei der Anfertigung der Dissertation.

Des weiteren möchte ich PD Dr. G. Scheiner-Bobis aus dem Institut für Biochemie und Endokrinologie der Justus-Liebig-Universität für die Nutzung des Genlabors zur Durchführung der Expressionsstudien und die vielfältigen Anregungen danken, die die molekularbiologische Arbeit erst ermöglichten.

Für die Durchführung der endokrinologischen Blutuntersuchungen bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann und seinen Mitarbeitern.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. K. Failing und seinen Mitarbeitern aus der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere sowie des Instituts für Biochemie und Endokrinologie bedanken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Schließlich gilt mein herzlichster Dank meiner Familie, meinem Freund Stephan und all den lieben Menschen, die mich auch in schwierigeren Zeiten mit aufmunternden Worten und Taten motiviert und unterstützt haben.